



Université
de Toulouse

THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Khalid RBII

le : mardi 13 juillet 2010

Titre :

Formation d'agrégats de hauts poids moléculaires dans la gélatine et
comportement en solution aqueuse

JURY

Mme Anne-Marie BUCHERT

Pr. Camille MICHON

Pr. Françoise SILVESTRE

Dr. Olivier SUREL

Dr. Frédéric VIOLLEAU

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire d'Agrophysiologie de l'E.I.Purpan

Directeur(s) de Thèse :

Dr. Olivier SUREL

Dr. Frédéric VIOLLEAU

Rapporteurs :

Pr. Luc PICTON

Dr. Jean-Louis DOUBLIER

REMERCIEMENTS

Ce travail, dirigé par les Docteurs Olivier Surel et Frédéric Violleau, est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire d'Agrophysiologie de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (Toulouse, 31) et la société Rousselot S.A.S (Isle sur la Sorgue, 84).

Mes premiers remerciements vont à Olivier Surel et Frédéric Violleau, Enseignant Chercheur à l' l'E.I. Purpan qui ont co-encadré les recherches engagées au cours de cette thèse. Vous avez su me faire bénéficier de vos expériences et compétences, merci d'avoir jugé mon travail, de m'avoir encouragée et surtout pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces années (même si parfois sa n'a pas été évident).

Je tiens spécialement à remercier Mme Vassilia Théodorou-Bayle, Professeur à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et Directrice du laboratoire d'Agrophysiologie, pour m'avoir intégrée dans son équipe et pour son œil attentif sur l'avancement de mes travaux.

J'ai eu la chance de pouvoir réaliser ce travail dans de très bonnes conditions, grâce notamment à la société Rousselot qui en a assuré le financement et a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour mener à bien ces travaux. A ce titre, je tiens tout particulièrement à remercier Anne-Marie Buchert et Noëlle Brambati, pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à mon travail en y contribuant régulièrement grâce aux nombreuses réunions de travail que nous avons eues ensemble. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Alain Denis, Sylviane Guedj et Alain Giraud qui ont fortement participé à la mise en place de ce projet.

Je remercie également le personnel R&D de Rousselot, qui a su être très accueillant durant mes courts séjours au sein de l'entreprise.

Je remercie Maria-Angélica Usta-Bony, ma petite stagiaire, qui a su me supporter durant presque un an et qui a fortement contribué à l'avancement de cette thèse (Gracias).

Aux membres du Jury :

A Madame Camille Michon, Professeur à AgroParisTech, je lui adresse mes remerciements pour l'intérêt qu'elle a témoigné à l'égard de ce travail, ainsi que pour ces commentaires avisés. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

A Monsieur Jean-Louis Doublier, Directeur de Recherche INRA Bia-Nantes et Monsieur Luc Picton, Professeur des Universités à l'INSA de Rouen, qui ont accepté d'évaluer et de juger ce manuscrit en qualité de Rapporteur. Je tiens à les remercier pour l'intérêt qu'ils ont accordé à la lecture de ce manuscrit et leur exprimer ma profonde gratitude.

Madame Françoise Silvestre, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Toulouse, m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce Jury. Je lui sais gré pour cette participation.

Je tiens également à remercier :

Les membres du laboratoire d'Agrophysiologie de l'E.I.Purpan : Monique Berger, Anne Calmon, Cécile Levasseur, Hélène Tormo, Jean Daydé, Didier Kleiber et Alban Jacques, à qui j'adresse mes sincères remerciements pour leurs échanges scientifiques stimulants et leur soutien moral.

Mireille Gaucher, pour sa disponibilité, son aide au quotidien, ces conseils techniques précieux et sa patience notamment pour mon port régulier de la blouse.

Je n'oublie pas mes amis thésards avec qui j'ai partagé mon bureau et mes fous rires: Marie-Pierre Artigot (la Gazelle), Marc Bourgin (l'informaticien), Gérome Pouzoulet (le lève tard) et Abderrakib Zahid (le patient).

Je n'oublie pas ceux qui ont été mes compagnons au laboratoire : Céline, Cherryl, Christel, et Mickaël.

Mes amitiés au personnel de l'E.I.Purpan que j'ai côtoyé tous les jours.

J'exprime mon immense gratitude et mon amour à toute ma famille.

A ma petite maman que j'aime tant.....

RESUME

Formation d'agrégats de hauts poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse

La gélatine est un ingrédient utilisé dans de nombreuses industries et sa solubilité influence beaucoup ses propriétés fonctionnelles. Des défauts de solubilité sont parfois constatés, notamment suite à un stockage de la gélatine en grains à température élevée et humidité importante. Cette perte de solubilité pourrait être due à la présence de molécules de haut poids moléculaire.

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments de compréhension sur la perte de solubilité observée dans les solutions de gélatine. L'utilisation d'une technique de Fractionnement par Flux-Force couplée à une diffusion de la lumière Multiangulaire, a mis en évidence la présence d'agrégats de haut poids moléculaires dans les solutions de gélatine (de 9.5 à $30.2 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹). Ces agrégats n'avaient jamais pu être identifiés par les techniques classiques d'exclusion stérique car elles sont souvent éliminées dans le volume d'exclusion des colonnes. La quantité d'agrégats formés ne cesse d'augmenter lors d'un traitement thermique à 75 °C, aboutissant à l'insolubilité de la gélatine.

La compréhension du mécanisme à l'origine de cette perte de solubilité montre l'implication de la lysine disponible, dans l'apparition des agrégats. La lysine libre réagissant au cours du traitement thermique provoquerait la formation d'agrégats qui modifient le comportement de la gélatine en solution aqueuse.

Les paramètres de caractérisation de l'AFIFFF-MALS permettent de discriminer partiellement des échantillons de gélatine dont les comportements en solubilité sont différents. Rajoutés aux paramètres classiques de caractérisation comme la viscosité à 6.67% et au dosage de la lysine disponible, la discrimination devient parfaite.

MOTS CLES : Solubilité, Fractionnement Flux-Force, Diffusion de la lumière Multiangulaire, Lysine.

ABSTRACT

Formation of high molecular weight aggregates in gelatin and behavior in aqueous solution

Gelatin is an important product for several industries and its solubility dramatically influences its functional properties. The lack of solubility observed in gelatin is supposed to be due to the occurrence of molecules with high molecular weights, especially after heat treatments.

In order to be able to predict the gelatin behaviour, a new technique for its analysis has been developed with an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AFIFFF-MALS) coupled to a multiangular light scattering. The AFIFFF-MALS analysis showed high molecular weight fractions in gelatin ranging from 9.5 to $30.2 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ which has not been shown previously with alternative techniques such as size exclusion chromatography. After heat treatment of dry gelatin in an oven at 75°C , some huge aggregates appeared, of which size and density increased and led to partial insolubilisation of gelatin into water.

The mechanism responsible for this phenomenon involved lysine residues which plays a very important role in gelatin properties. Quantification of available lysine in gelatin samples by LC-UV has been developed. Thermal treatment during 8 days led to a decrease of free lysine content whereas, at the same time, the molecular weight of gelatin fractions increased and α helixes formation in solution was strongly affected. Intermolecular cross-links led to high molar mass compounds and limited protein chain unfolding.

From an industrial point of view, AFIFFF-MALS analysis can help to discriminate gelatin samples in regard to their solubility. If other parameters are added (6.67 % viscosity and free lysine) the discrimination was perfect.

KEYWORDS : Solubility, Field-Flow Fractionation, Multiangular Light Scattering, Lysine.

Table des matières

| | |
|---|----|
| Introduction Générale | 10 |
| I. Introduction..... | 10 |
| II. Objectifs des travaux réalisés..... | 11 |
| III. Organisation du Mémoire | 12 |
| Chapitre I. Etat des connaissances | 14 |
| I. Introduction..... | 15 |
| II. Rappels sur la structure des protéines | 17 |
| A. Constitution des protéines..... | 17 |
| B. Conformation des protéines : | 19 |
| III. Le Collagène | 21 |
| IV. Du Collagène à la Gélatine | 23 |
| A. Procédé de fabrication de la gélatine | 23 |
| B. Tests de contrôle qualité du produit fini | 27 |
| V. La gélatine..... | 30 |
| A. Structure et Composition | 30 |
| B. La gélatine en solution | 33 |
| C. Propriétés technologiques et caractéristiques de la gélatine | 35 |
| VI. Applications | 36 |
| A. Industrie alimentaire et photographique | 36 |
| B. Industrie pharmaceutique..... | 38 |
| C. Les films de gélatine | 38 |
| VII. Mécanismes à l'origine de la Réticulation..... | 39 |
| A. Réaction de désamination oxydative..... | 39 |
| B. Réaction avec les sucres..... | 40 |
| C. Réaction avec des composés aldéhydiques | 41 |
| D. Influence du taux d'humidité et de la température..... | 42 |
| Chapitre II. Analyse de la gélatine par AFIFFF-MALS | 44 |
| I. Introduction..... | 45 |
| II. L'Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AFIFFF)..... | 47 |
| III. Diffusion de la lumière Multiangulaire (MALS)..... | 50 |
| IV. Analyse de la gélatine par AFIFFF-MALS..... | 53 |
| A. Mise au point de la méthode | 53 |

| | |
|---|------------|
| B. Fractogramme d'une solution de gélatine..... | 54 |
| C. Identification des différentes fractions..... | 55 |
| V. Conclusion | 58 |
| Chapitre III. Etude du vieillissement de la gélatine par AFIFFF-MALS | 59 |
| I. Introduction..... | 60 |
| II. Suivi du « vieillissement accéléré » de la gélatine par AFIFFF-MALS | 61 |
| III. Bilan de l'étude du vieillissement accéléré de la gélatine par AFIFFF-MALS | 69 |
| Chapitre IV. Renaturation de la gélatine | 72 |
| I. Introduction..... | 73 |
| II. Etude de la renaturation de la gélatine par AFIFFF-MALS..... | 76 |
| III. Bilan du suivi de renaturation de la gélatine par AFIFFF-MALS | 88 |
| A. Gélatine native : | 88 |
| B. Gélatine vieillie..... | 89 |
| C. Polarimétrie..... | 91 |
| Chapitre V : Compréhension du mécanisme à l'origine de l'insolubilité..... | 95 |
| I. Introduction..... | 96 |
| II. Méthode de détermination de la lysine disponible avec FDNB..... | 100 |
| III. Détermination du taux de lysine libre dans la gélatine durant le vieillissement accéléré | 101 |
| IV. Bilan de cette étude..... | 117 |
| Chapitre VI. Application des résultats à la prédiction de la solubilité | 118 |
| I. Introduction..... | 119 |
| II. Matériels et méthodes | 120 |
| A. Données Rousselot..... | 120 |
| ➤ La viscosité | 120 |
| ➤ Test classique de dissolution..... | 120 |
| B. Données AFIFFF-MALS | 122 |
| C. Détermination du taux de lysine | 123 |
| III. Analyses AFIFFF-MALS suivant le procédé d'extraction | 124 |
| IV. Analyses statistiques | 125 |
| A. Discrimination des échantillons selon leur vitesse de dissolution | 125 |
| B. Discrimination des échantillons en fonction du site de production | 129 |
| V. Conclusion | 131 |
| Conclusion Générale..... | 132 |

| | |
|--|---------|
| Annexes | 135 |
| La polarimétrie | 136 |
| A. Principe de la mesure | 136 |
| B. Cas du collagène et de la gélatine | 136 |
| C. Appareillage..... | 137 |
| D. Mode opératoire | 138 |
| E. Résultats de polarimétrie..... | 139 |
| Tables des illustrations | 140 |
| Références Bibliographiques | 143 |

Introduction Générale

I. Introduction

Avec une production annuelle de 330 000 tonnes en 2009, la gélatine est devenue un produit de consommation usuelle que l'on retrouve pratiquement dans tous les domaines de la vie moderne.

L'intérêt pour cette macromolécule a été croissant, tant les avantages sont importants dans la consommation courante : pas de toxicité, quantité abondante de matières premières disponibles, choix de différentes qualités pour chaque application, compatibilité avec d'autres constituants dans de nombreuses formulations, etc.

Ses propriétés fonctionnelles uniques font de la gélatine un des ingrédients importants de l'industrie alimentaire, photographique, cosmétique et pharmaceutique. (Schrieber & Gareis, 2007 ; Segtnan *et al.*, 2003). Ses propriétés technologiques et biopharmaceutiques uniques, font d'elle un excipient extrêmement important et polyvalent pour des applications pharmaceutiques, notamment dans la fabrication des gélules destinées à contenir et libérer des médicaments après ingestion par le patient.

Une des priorités des fabricants de gélatine est de contrôler la qualité de leurs produits, notamment ceux destinés au secteur pharmaceutique. En effet, il est important de fournir des lots de gélatine de qualité constante et stable dans les conditions de stockage. Des études ont montré que dans certaines conditions, spécialement lorsque la gélatine est soumise à des températures élevées et à une humidité importante, la gélatine s'insolubilise (Meyer *et al.*, 2000). Ce phénomène induit la formation d'un film translucide autour de la gélule, limitant ainsi la libération du principe actif contenu à l'intérieur de la gélule (Murthy *et al.*, 1989).

L'étude de l'insolubilité de la gélatine en solution aqueuse a fait l'objet de peu de travaux, cependant il est souvent émis que ce phénomène est lié à une agrégation due à des réticulations (Marks *et al.*, 1968). Ce phénomène peut conduire à la formation de structures de hautes masses molaires. Les fonctionnalités et les applications industrielles des biopolymères dépendant fortement de la distribution moléculaire (Bosch & Gilens, 2003), la caractérisation de ce paramètre de façon précise a un grand intérêt pour comprendre les propriétés d'un produit (Viebke & Williams, 2000).

Marks *et al.*, (1968) ont été parmi les premiers à recréer ce phénomène d'insolubilité de la gélatine, sans ajout d'agent réticulant, en stockant simplement la gélatine dans une étuve ventilée à 75°C. Ceci les a amené à supposer que le phénomène était observé en raison d'une agrégation des molécules de gélatine probablement due à des réticulations et/ou des liaisons hydrogènes. L'intérêt de déterminer de façon précise la distribution en masse moléculaire de la gélatine afin de comprendre ce phénomène d'insolubilité paraît donc d'autant plus important.

Différentes techniques analytiques peuvent être utilisées pour déterminer la masse moléculaire des biopolymères (perméation sur gel, diffusion de la lumière, gel d'électrophorèse, etc.). Dans le cas de la gélatine, la technique couramment utilisée est la « chromatographie d'exclusion stérique » (SEC). Cette technique, couplée à des détecteurs comme la diffusion de la lumière multiangulaire (MALS), permet d'avoir une estimation absolue de la masse moléculaire des différentes fractions protéiques constituant la gélatine. Cependant cette technique présente de nombreuses restrictions et certains auteurs ont montré qu'elle ne permettait pas d'identifier les molécules de très hauts poids moléculaires (Meyer & Morgenstern, 2003).

Récemment, Fraunhofer *et al.*, (2004) ont mis en évidence dans les solutions de gélatine, l'existence de fractions protéiques avec un domaine de masse moléculaire compris entre 1.10^4 et 1.10^7 g.mol⁻¹, que l'on ne pouvait observer par chromatographie d'exclusion stérique. Ceci a été possible grâce à une technique dite de Fractionnement par Flux croisé utilisant une cellule asymétrique couplée à une détection multiangulaire laser (Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation-Multi Angular Light scattering AF4FFF-MALS).

Cette technique pourrait donc permettre d'accéder aux paramètres de masse moléculaire que l'on suppose être à l'origine de cette perte de solubilité.

II. Objectifs des travaux réalisés

Pour comprendre les problèmes de solubilité observés dans les solutions de gélatine et afin de fournir des lots de gélatine de qualité constante à ses clients, la *Société Rousselot* (2^{ème} producteur de gélatine au monde) a mis en place un programme de recherche sous la forme d'une thèse CIFRE en collaboration avec le Laboratoire d'Agro-Physiologie de l'EI Purpan.

Ce dernier a acquis une compétence dans l'analyse des macromolécules notamment par AFIFFF-MALS (Lemelin *et al.*, 2005).

L'objectif de cette thèse est de montrer dans un premier temps ce qu'un outil analytique tel que l'AFIFFF-MALS peut apporter de plus qu'une technique telle que la SEC dans l'estimation de la distribution en masse moléculaire de la gélatine. Dans un second temps, de voir si au cours d'un vieillissement de la gélatine apparaît un phénomène d'agrégation aboutissant à l'insolubilité de celle-ci. Une agrégation qui peut être observé grâce à une technique telle que l'AFIFFF-MALS et dont on pourra corrélérer la masse molaire à la perte de solubilité. Enfin, un dernier point est sur la compréhension d'un des phénomènes chimique pouvant être à l'origine de cette agrégation, notamment le rôle de la lysine qui est souvent évoqué comme étant un précurseur de cette perte de solubilité. Ces résultats pourraient ensuite être appliqués au niveau industriel pour prédire la solubilité de la gélatine en solution aqueuse.

III. Organisation du Mémoire

Pour répondre à ces objectifs, la thèse s'articule autour de 6 chapitres :

Le **chapitre I** est dédié à la gélatine, il décrit le mode d'obtention de la gélatine, sa composition et sa structure, ainsi que les différentes propriétés fonctionnelles et applications de celle-ci.

Dans le **chapitre II**, nous présentons l'apport d'une technique analytique comme l'AFIFFF-MALS, dans la détermination des masses moléculaires dans les solutions aqueuses de gélatine.

Le **chapitre III** est consacré à l'étude du phénomène d'agrégation observé sur de la gélatine en grains au cours d'un vieillissement accéléré et ses conséquences sur la perte de solubilité.

Le **chapitre IV** s'oriente vers l'impact du phénomène d'agrégation observé au cours du vieillissement, à savoir notamment si le phénomène est simplement dû à une renaturation de la gélatine en solution par formation de liaisons faibles ou s'il est lié à une réticulation.

Le **chapitre V**, est une première approche de l'identification du processus chimique à l'origine de la réticulation observée au cours du vieillissement, notamment le rôle de la lysine dans la formation des agrégats à l'origine de l'insolubilité.

Le **chapitre VI** présente l'application des paramètres de caractérisation de la gélatine à une problématique industrielle de prédiction de la qualité de la gélatine pour la fabrication de gélules.

Chapitre I. Etat des connaissances

I. Introduction

La gélatine alimentaire a une longue histoire. Dans les temps anciens, elle était utilisée comme une « colle biologique », et au cours du temps, son industrialisation, a amené à l'utiliser dans de nombreuses applications.

A l'époque de la Haute Antiquité, en Egypte, les artisans étaient en mesure de produire de la colle à partir d'os et de peaux d'animaux, pour assembler les pièces de bois entre-elles. En Europe, l'industrialisation de la fabrication de colle à partir du collagène a démarré dès la fin du 17^{ème} siècle aux Pays-Bas et dès le début du 18^{ème} en Angleterre. Mais l'industrie de la gélatine à usage alimentaire n'est apparue en France, que vers le début du 19^{ème} Siècle, à la demande de l'intendance militaire de Napoléon Bonaparte afin de l'utiliser comme une source de protéines pour nourrir les troupes françaises, lorsque la viande devenait rare (Shrieber & Gareis, 2007).

Un deuxième essor de la production de la gélatine a eu lieu aux Etats-Unis vers 1850 (fabrication de desserts sous forme de gelées et de capsules à usage pharmaceutique) et après 1878 (premières émulsions photographiques), puis vers 1930 en Europe, quand la source des peaux de porcs fraîches est venue s'ajouter aux matières premières traditionnelles. Depuis lors, la production de gélatine est destinée à de multiples usages. Néanmoins trois secteurs se distinguent dans l'utilisation de celle-ci : les industries alimentaire, pharmaceutique et photographique.

Aujourd'hui la gélatine est devenue un produit de consommation courante. Elle trouve sa place tout aussi bien dans les industries non alimentaires qu'alimentaires. Elle fait partie de nombreux aliments et est utilisée autant par les ménagères que par les artisans ou les grandes industries agroalimentaires. De plus, de par sa nature protéique, elle peut être intégrée aux préparations alimentaires sans être considérée comme un additif ce qui explique son utilisation si répandue.

Cependant, avec certains groupes religieux qui ne consomment pas de porc et la crise de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), les fabricants ont été amenés à rechercher nouvelles matières premières. Ainsi, l'utilisation de matières premières telles que le poisson et la volaille sont très récentes, mais leur utilisation restreint fortement les domaines d'applications du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques moins intéressantes.

A l'avenir, l'intérêt de la gélatine ne sera pas seulement limité aux applications classiques. De nouvelles utilisations dans les soins médicaux et dans les domaines techniques

spécialisés se traduiront par l'utilisation de gélatine et d'hydrolysats de gélatine (Schrieber & Gareis, 2007).

La production annuelle de gélatine a connu un essor considérable de 1974 à 2005, passant d'une production de 130 000 tonnes/an à plus de 300 000 tonnes/an (*Tableau 1*). Aujourd'hui, le marché de la gélatine est organisé principalement autour de deux grandes sociétés que sont Gélita et Rousselot, qui a eux-deux produisent plus de la moitié de la gélatine mondiale. Actuellement, l'industrie de la gélatine compte plus de 90 sites de production dans 30 pays.

Tableau 1: Bilan mondial de la production en gélatine (milliers de tonnes) (Gelatin Handbook)

| | 1974 | 1990 | 2000 | 2005 |
|---------------------------|------|------|------|------|
| Europe de l'Ouest | 62 | 83 | 118 | 119 |
| Europe de l'Est | 12 | 10 | 4 | 7 |
| Amérique du Nord | 31 | 35 | 57 | 61 |
| Amérique du Sud | 5 | 21 | 35 | 52 |
| Asie | 15 | 38 | 38 | 59 |
| Océanie et Afrique | 5 | 6 | 6 | 7 |
| Production Total | 130 | 193 | 258 | 305 |

Malgré la crise de l'ESB qui a éclaté entre 1996 et 2000, la production de gélatine n'a cessé d'augmenter. Cette explosion de la production a été rendue possible par l'utilisation croissante de gélatine dans la fabrication de gélules dures, molles et dans les confiseries. La production devrait continuer d'augmenter dans les prochaines années avec une population qui ne cesse de croître passant de 6,1 en 2004 à 9,1 milliard en 2050. (Projections établies d'après les Nations Unies).

Nous nous proposons dans ce qui suit, de présenter la gélatine plus en détail, notamment le mode d'obtention, les caractéristiques biochimiques, mais aussi les propriétés et les diverses applications de celle-ci.

La gélatine est obtenue par dégradation du collagène qui est la protéine la plus répandue chez les mammifères, car le collagène est le constituant majeur des tissus conjonctifs et des matrices des os. On la retrouve également chez les poissons, les oiseaux, etc.

Nous développons, dans ce qui suit, quelques notions sur les propriétés structurales du collagène avant d'exposer les caractéristiques de la gélatine, mais avant cela un bref rappel sur la structure des protéines.

II. Rappels sur la structure des protéines

A. Constitution des protéines

Une protéine est un polymère organique résultant de la condensation d'acides aminés par formation de liaisons peptidiques. Les acides aminés constitutifs sont appelés résidus, le radical R présent sur le résidu est appelé chaîne alkyl (*Figure 1*).

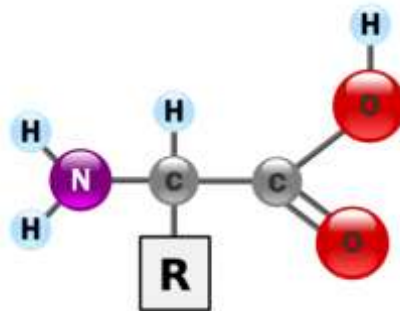


Figure 1: Formule chimique générale des acides aminés

Deux acides aminés peuvent s'associer de façon covalente pour former un dipeptide. La liaison ainsi établie est la liaison peptidique, elle résulte de la combinaison entre le groupement carboxyle (COOH) d'un acide aminé et le groupement amine (NH₂) de l'autre, avec perte d'une molécule d'eau (*Figure 2*).

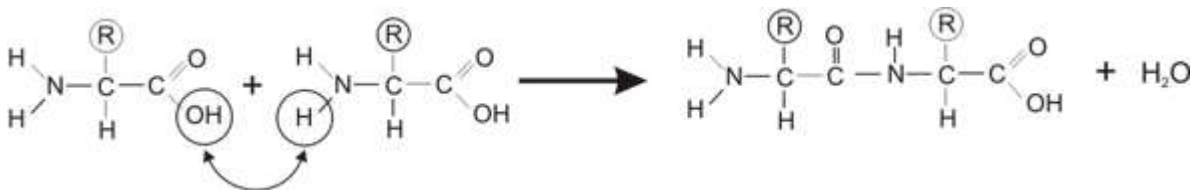
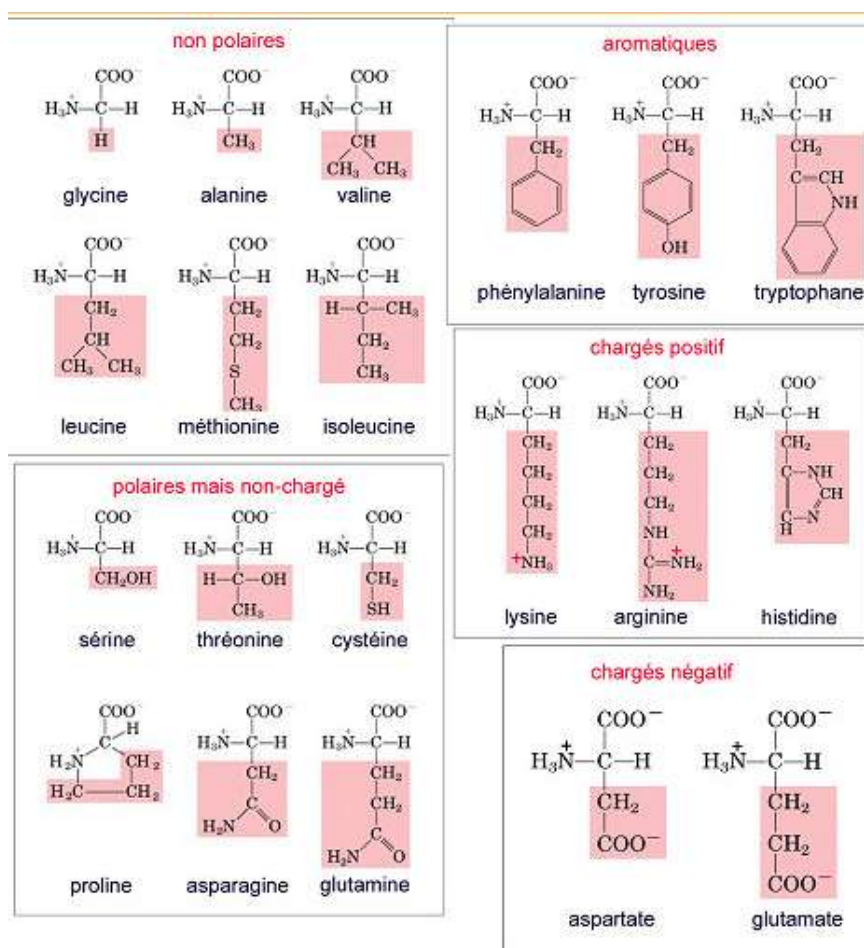


Figure 2: Formation liaison peptidique

La répétition de cette réaction n fois, permet ainsi d'obtenir un peptide ($n < 100$) ou une protéine ($n > 100$).

Le Tableau 2 présente la structure des 20 acides aminés les plus fréquemment rencontrés.

Tableau 2: Liste des acides aminés



La séquence d'acides aminés, ou structure primaire, détermine presque à elle seule les propriétés physico-chimiques et structurales des protéines, en particulier ses interactions avec l'eau. Les protéines interagissent avec l'eau par leurs liaisons peptidiques (interactions dipôle-dipôle ou liaison hydrogène) ou par les chaînes latérales (interactions avec les groupements polaires, ionisés et même non polaires). La solubilité des protéines dans l'eau dépend de la compétition entre les interactions protéines-protéines et les interactions protéines-eau. Elle dépend des paramètres thermodynamiques du système tels que la température, le pH ou la force ionique :

- **Influence du pH** : une chaîne protéique est caractérisée par son point isoélectrique. C'est la valeur de pH pour laquelle il y a autant de charges positives que de charges négatives sur la chaîne. Dans ce cas, la solubilité de la protéine est minimale en

raison de l'attraction entre différentes parties de la chaîne. En déplaçant le pH, les chaînes protéiques comportent alors davantage de charges de même signe : la solubilité est plus grande.

- Influence de la force ionique : en solution saline, les ions de sels neutres peuvent réagir avec les charges des protéines et donc abaisser les interactions électrostatiques entre charges opposées.

Sur la *Figure 3*, nous pouvons observer les différents types d'interactions susceptibles de stabiliser les structures protéiques.

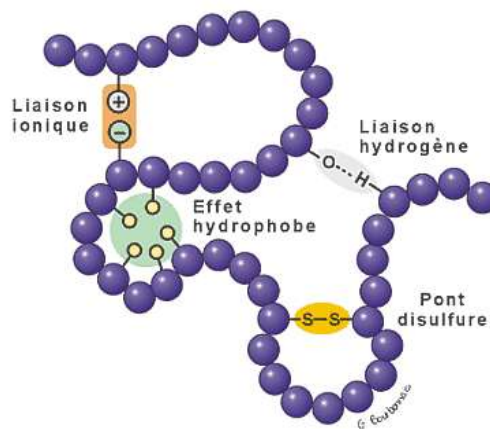


Figure 3: Types de liaisons susceptibles de se former entre les différentes chaînes d'une molécule de protéine

B. Conformation des protéines :

Chaque protéine est caractérisée par sa conformation, c'est-à-dire son organisation tridimensionnelle : les protéines fibreuses, par exemple, sont composées de chaînes polypeptidiques assemblées le long de l'axe commun (collagène, kératine....). Les protéines globulaires sont formées de chaînes enroulées sur elles-mêmes engendrant des formes sphériques ou ellipsoïdales (sérum albumine). On distingue quatre niveaux d'organisation (*Figure 4*):

- Structure primaire : elle caractérise la séquence des acides aminés au sein de la chaîne principale de la protéine
- Structure secondaire : elle est représentative de la forme spatiale de certaines parties de la chaîne selon un axe principal (hélice α , feuillet β , ...)
- Structure tertiaire : elle indique l'organisation spatiale générale propre à chaque protéine, c'est à dire le positionnement respectif des différentes chaînes. Elle est fortement dépendante des conditions régnant dans le milieu environnant (nature du solvant, viscosité, température, pH)
- Structure quaternaire : elle rend compte de l'état d'association des protéines par liaisons hydrogène, hydrophobes ou disulfures.

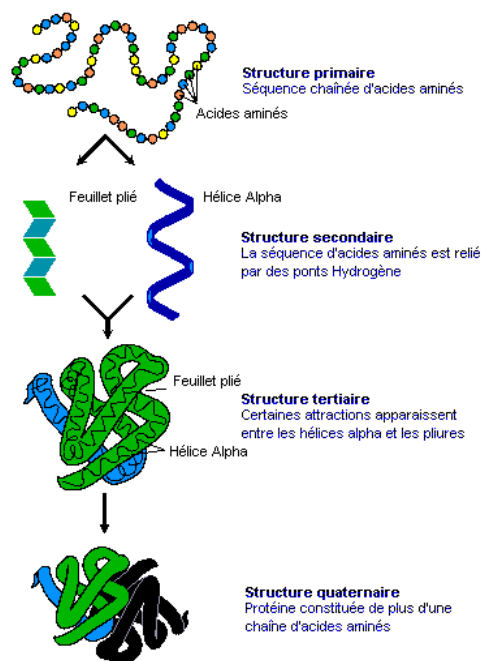


Figure 4: Schématisation des différentes structures d'une protéine (Astrosurf)

La dénaturation d'une protéine consiste à rompre ces interactions sans briser les liaisons peptidiques. Ces molécules « dépliées » vont dans certaines conditions s'agréger et former un gel.

La gélatine est le produit de dénaturation du collagène, protéine que nous allons décrire à présent.

III. Le Collagène

Représentant un tiers des protéines totales chez les mammifères, le collagène est une protéine fibrillaire dont la structure chimique a été décrite par de nombreux auteurs (Stainsby, 1977 ; Gorham, 1991). Son rôle est primordial dans le développement des tissus, il se présente sous la forme de fibres caractérisées par une forte résistance mécanique, protégeant ainsi les muscles contre de trop fortes tensions.

La composition chimique du collagène varie avec son origine. Cependant, on retrouve chez toutes les espèces des similitudes qui expliquent sa fonction de tissu conjonctif et le maintien de sa structure tridimensionnelle. L'unité de base du collagène est le tropocollagène, triple hélice droite de 300 nm de longueur. Le tropocollagène comprend 3 chaînes polypeptidiques α de 100 000 g.mol⁻¹, organisées en hélice gauche avec environ 3 acides aminés par tour (Figure 5).

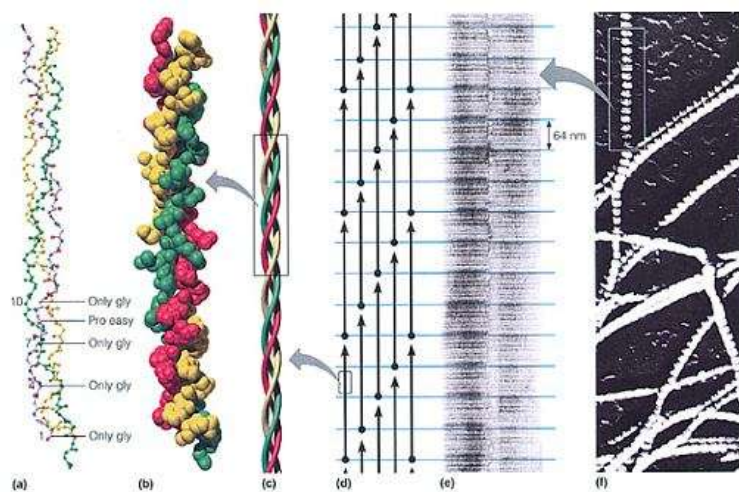


Figure 5: Structure du collagène à différentes échelles :
 (a, b et c) : Conformation en triple hélice (d) : Structure d'une fibrille
 (e et f) : Fibre de collagène au microscope électronique (cegep-ste-foy.qc.ca)

Il existe plusieurs types de chaînes α différant par leur composition en acides aminés dont les combinaisons sont à l'origine des différents types de collagènes. Les acides aminés prépondérants sont la glycine (33% des acides aminés totaux), la proline et l'hydroxyproline (21%), et enfin l'alanine (10%). Grâce à son atome d'hydrogène en position latérale, la glycine joue un rôle stabilisateur : elle favorise le rapprochement et l'emboîtement des chaînes entre-elles. La proline et l'hydroxyproline, de part leurs structures, occupent des positions où les chaînes sont moins resserrées, assurant ainsi une certaine rigidité à la structure. On sait également que le groupement hydroxyle de l'hydroxyproline participe à la

formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes et avec les molécules d'eau piégées dans la triple hélice (Ward & Courts, 1977).

A la différence des protéines globulaires, on rencontre dans le collagène, une certaine régularité des séquences :

- la glycine apparaît une fois sur trois le long de la chaîne ;
- les séquences Glycine-Proline-X et Glycine-Proline-Hydroxyproline sont fréquentes.

Les trois chaînes, enroulées les unes autour des autres, établissent des liaisons hydrogènes entre elles. Les résidus glycine se trouvent à l'intérieur de la triple hélice, les groupements latéraux vers l'extérieur où ils peuvent être engagés dans des interactions intermoléculaires. Dans une fibre de collagène, ces trois chaînes ainsi que les molécules de tropocollagène sont reliées par des ponts covalents qui rendent la structure peu extensible. Chez l'animal jeune, les ponts covalents qui relient les molécules du tropocollagène entre-elles, sont relativement labiles. Au cours du vieillissement, il se forme des liaisons covalentes intra- et intermoléculaires dites de « réticulation » qui assurent la continuité des molécules de collagène et augmentent sa stabilité thermique (Bailey, 1985). Des études de Browlee *et al.*, (1981), sur la glycosylation enzymatique des protéines ont montré qu'une réaction de Maillard entre des sucres réducteurs et des acides aminés pouvait être responsable du vieillissement du collagène.

Il est possible de distinguer cinq types de collagène suivant leur structure et leur origine tissulaire :

- le type I, qui est constitué de triples hélices ayant deux chaînes polypeptidiques identiques α_1 et une chaîne α_2 de composition différente. On le retrouve dans les tendons, la peau et les os.
- les types II et III sont également des collagènes fibrillaires mais composés de trois chaînes identiques α . Le collagène de type II est localisé dans les cartilages et corps vitreux de l'œil, tandis que le type III, dans les vaisseaux sanguins et les muscles squelettiques.
- les types IV et V, présents dans de nombreuses membranes, qui présentent des compositions plus complexes.

(α_1 et α_2 sont des chaînes polypeptidiques constitutives des différents types de collagène qui se différencient par leur composition en acides aminés).

Lors de l'extraction de la gélatine à partir du collagène, les liaisons hydrogène sont brisées par élévation de température et la structure en hélice disparaît. Les chaînes adoptent la conformation pelote, le collagène est devenu gélatine.

IV. Du Collagène à la Gélatine

A. Procédé de fabrication de la gélatine

La conversion du collagène en gélatine a été longuement étudiée. (Harding, 1964; Veis, 1964; Ward & Courts, 1977). Elle se réalise en deux étapes : la solubilisation du collagène (soit en milieu acide, soit en milieu basique) et sa conversion en gélatine. Cette dernière est le résultat de la dénaturation de la structure tertiaire de la triple hélice de tropocollagène. Les chaînes se dissocient et adoptent alors une configuration pelote statistique (Jones, 1987).

La fabrication industrielle de la gélatine consiste principalement à contrôler l'hydrolyse du collagène et à convertir le produit en un matériel soluble avec des propriétés physico-chimiques souhaitées, telles que la force en gel, la viscosité, le point isoélectrique, etc.

Il existe essentiellement deux procédés pour la fabrication de la gélatine :

- Le procédé acide qui s'applique surtout sur des matériaux peu réticulés comme le collagène de la peau de porc. C'est un procédé peu coûteux et rapide (2 jours), utilisé principalement pour l'industrie alimentaire.
- Le procédé alcalin, méthode longue (45 à 90 jours) et plus coûteuse, principalement utilisé pour des collagènes plus complexes comme ceux provenant des os et peaux de bovins. Son objectif est de détruire les liaisons chimiques encore présentes dans le collagène. Ce procédé permet de fabriquer de la gélatine principalement utilisées dans l'industrie pharmaceutique (capsules), photographique (films) et alimentaire.

Le processus de fabrication de la gélatine peut être schématisé de la façon suivante (Figure 6) :

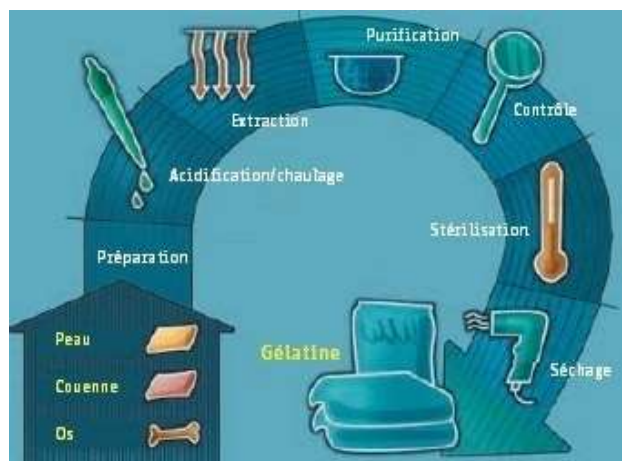


Figure 6: Procédé de fabrication industrielle de la gélatine (Gelatine Manufacturers of Europe)

1. Déminéralisation des os et préparation de l'ossein :

L'étape de déminéralisation intervient dans le cas d'utilisation d'os comme matière première. Les os dégraissés doivent être débarrassés de leur support minéral (hydroxyapatite). Cette opération est réalisée par un trempage de quelques semaines en milieu acide (HCl 5%). La déminéralisation ne modifie pas la composition en acides aminés mais certaines liaisons peptidiques ou intermoléculaires peuvent être hydrolysées. Les phosphates sont séparés du surnageant sous la forme de phosphate bicalcique, par précipitation à l'aide d'un lait de chaux (sous-produit de l'industrie de la gélatine). Toutefois, la matière organique a conservé sa forme mais est devenue élastique : c'est l'ossein.

2. Prétraitement :

Le procédé de prétraitement a pour objectifs le gonflement et le ramollissement des peaux et de l'ossein, en préparation à la dénaturation et à l'extraction de la gélatine. Durant cette étape, des peptides et des liaisons intermoléculaires sont rompus, la température de fusion du gel (T_m) diminue par interaction avec le solvant, certaines impuretés sont éliminées. Cependant, un gonflement trop intense peut conduire à une dégradation excessive de la matière première.

Il existe deux variantes majeures du prétraitement : le procédé alcalin (chaulage) et le procédé acide. Le prétraitement chaulé se distingue du prétraitement acide, notamment en ce qui concerne les modifications apportées à la matière première. Ainsi, le prétraitement acide conduit à une réorganisation physique de la structure du collagène alors que le prétraitement chaulé engendre des modifications chimiques importantes, notamment

l'augmentation du nombre de carboxyles libres par transformation des résidus asparagine et glutamine en acides aspartique et glutamique (Veis, 1964).

➤ Traitement alcalin :

La peau et l'os sont traités par du lait de chaux (pH 12) pendant 6 à 12 semaines, afin d'épurer le collagène et de casser les liaisons covalentes pour le rendre soluble à 60°C. Cette étape est contrôlée en température entre 18-20°C. Le procédé de chaulage se développe dans une cuve avec un système d'agitation à air comprimé et la température est contrôlée grâce à la température d'entrée du lait chaux.

Le lavage, consiste ensuite à éliminer le lait de chaux. Pour ce faire, l'osséine passe sur un tapis vibrant où elle est rincée à l'eau. Puis, 12 h avant la cuisson, un bain d'acide phosphorique permet de ramener le pH à 7.

➤ Traitement acide :

Le traitement acide du collagène est particulièrement approprié aux matériaux moins réticulés, tels que la peau de porc et les os de jeunes bovins. Ce traitement permet une réduction des coûts, en raison des temps courts de préparation de la matière première.

La matière première est lavée et trempée dans les solutions acides minérales diluées, dont la concentration ne doit pas excéder 5% et dont le pH doit se situer autour de 3.5 et 4.5. Les acides minéraux utilisés peuvent être l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique. Ce traitement à l'acide continue jusqu'à ce que la matière première soit entièrement acidifiée et atteigne un maximum du gonflement. La température du traitement est habituellement la température ambiante de l'usine, environ 15 à 20°C. La durée du traitement dépend de la nature de la matière première, de la température et de la concentration de l'acide, varie entre 10 et 48 h.

Les gélatines issues d'un traitement alcalin sont couramment désignées sous l'appellation « gélatine type B » tandis que les gélatines issues d'un traitement acide sont appelées « gélatine type A ».

3. Extraction de la gélatine :

C'est l'étape du procédé appelée « cuisson ». On y parle de bouillon, de durée de cuisson, de température, d'égouttage, etc.

Pour obtenir de la gélatine, on solubilise, ce qui reste de l'os ou de la peau, après l'avoir déminéralisé par acidification et épuré par chaulage et lavage, ou ce qui reste de la peau. Ce « jus » de gélatine va être successivement filtré, déminéralisé, concentré, refiltré, puis le pH sera ajusté à la demande du client.

- Cuisson : elle consiste à faire passer la gélatine en solution dans de l'eau chaude acidulée, de température croissante d'une extraction à l'autre. La matière subit ainsi une suite de 5 à 6 extractions, chaque étapes durant plusieurs heures, la température variant de 55°C à 95°C voir 100°C pour la dernière. On obtient alors ce qu'on appelle un « Bouillon » ou extraits avec des propriétés différentes afin d'obtenir un « bouillon de gélatine ». Les solutions obtenues ou bouillons de gélatine ont une concentration approximative de 5% pour la première extraction, à la plus basse température (55°C).
- Pasteurisation et filtration : la pasteurisation a pour but de détruire un maximum de germes sur un échangeur à plaques, chauffé à la vapeur à 125°C et refroidi ensuite à l'eau à 60°C. La filtration permet ensuite de clarifier les « jus » de gélatine.
- Déminéralisation de la gélatine : ceci a pour but d'éliminer dans un bouillon de gélatine les cations et anions. Le bouillon de gélatine passe à travers de deux colonnes cationique et anionique.
- Concentration : le but est d'augmenter la teneur en gélatine, en évaporant l'eau, et ainsi obtenir un bouillon qui gélifie à 30°C. Le bouillon arrive à l'étape de concentration à 7% de gélatine et ressort avec une concentration en gélatine de l'ordre de 45%.
- Séchage : le but étant d'abaisser le pourcentage d'humidité de la gélatine, le gel est extrudé sous forme de filaments ou de « nouilles » pour augmenter sa surface d'échange et favoriser ainsi son séchage en continu, sous courant d'air filtré (*Figure 7*). Les « nouilles » séchées (10-15% d'humidité) sont ensuite broyées avant de subir des contrôles au laboratoire.



Figure 7: Nouilles de gélatine (Gelatin Handbook)

B. Tests de contrôle qualité du produit fini

Outre les tests de qualité prescrits par les autorités, les fabricants de gélatine effectuent de nombreux tests supplémentaires sur le produit final. Ces tests servent à vérifier les paramètres technologiques du produit. Plusieurs de ces méthodes d'analyse sont décrites ci-dessous :

➤ La force en gel (Bloom):

La première propriété de la gélatine utilisée par l'industrie est son effet gélifiant. Traditionnellement, ce paramètre détermine principalement le prix d'un type particulier de gélatine. La force en gel est donc, une des caractéristiques les plus importantes. La force en gel, ou Bloom, exprimée en gramme, est liée à l'élasticité mécanique du gel de gélatine. Elle permet la classification des gélatines. La mesure standardisée, faite grâce à un gélomètre, consiste à déterminer la force nécessaire pour enfoncer un piston (12.7 mm de diamètre) dans un gel de gélatine (de concentration 6.67% P/V) d'une profondeur de 4 mm. Le gel est gardé préalablement pendant 18 h à 10°C. Ces conditions sont décrites par les normes internationales (norme BSI n°757, norme AFNOR n°NFV 59-001-82). Les gélatines commerciales ont un Bloom situé entre 50 et 300g. Quelques exemples d'applications industrielles, selon les blooms, sont donnés dans le Tableau 3 :

Tableau 3: Exemples de Blooms par application

| Applications | Bloom (g) |
|-------------------------------|-----------|
| Guimauves | 75-125 |
| Nougats | 100-150 |
| Desserts/laitiers industriels | 150-250 |
| Capsules molles | 120-200 |
| Capsules dures | 150-280 |
| Photographie | 200-300 |

➤ La viscosité :

La mesure de la viscosité fait partie des paramètres « clé » de la gélatine, ce résultat est souvent de première importance. Elle dépend de trois paramètres : la concentration, la température et le pH. On la détermine à l'aide d'un viscosimètre capillaire. Elle est déterminée en mesurant le temps d'écoulement de 100 ml d'une solution à 6.67% de gélatine dans l'eau à 60°C (plus la solution est visqueuse, plus la durée d'écoulement est longue). On en déduit la viscosité par une corrélation entre le temps d'écoulement et les caractéristiques du capillaire. Les viscosités des solutions varient suivant l'extraction et l'origine de la gélatine.

➤ Le pH et le point isoélectrique (pI) :

La mesure standardisée s'effectue sur des solutions à 6.67%. Toutefois, en pratique, on le mesure également dans une solution de gélatine à 10% à 50°C-60°C avec des électrodes en verre. Toutes les solutions de gélatine ont un pH qui varie en fonction du traitement subi par les matières premières et qui est compris entre pH 4 et pH 6.5, donc légèrement acide.

Une propriété supplémentaire de la gélatine, qui influe son utilisation dans la stabilisation des émulsions, est le point isoélectrique (pI) qui joue sur son aptitude au mélange avec d'autres hydrocolloïdes. Le point isoélectrique ou isoionique est le pH pour lequel la charge nette de la protéine est égale à 0. Cette charge nette correspond à la somme des charges négatives et positives des chaînes latérales des acides aminés qui la composent.

pH > pI : la charge globale de la gélatine est négative

$\text{pH} < \text{pI}$: la protéine a une charge globale positive

Les gélatines de types A (voie acide) possèdent une zone isoélectrique comprise entre pH 8-9. Celle des gélatines B (voie alcaline) se trouve dans une région plus basse comprise entre 4.5 et 5. Dans les solutions avec un $\text{pH} < 5$, les gélatines sont globalement chargées positivement et un $\text{pH} > 9$, elles sont globalement chargées négativement.

➤ Autres propriétés :

- La couleur : elle dépend de la nature de la matière première utilisée dans sa préparation et du rang d'extraction (premier, deuxième bouillon, etc). Une solution de gélatine présente une coloration jaune brun plus ou moins marquée. Cette coloration a plus ou moins d'importance suivant les utilisateurs. La mesure de coloration s'effectue sur des solutions de gélatine à 6.67% à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.
- La turbidité (ou limpidité) : la turbidité peut être considéré comme un signe de mauvais traitement ou de gélatines de basse qualité. Elle est évaluée sur des gélatines en solution et en gel ; cette mesure reflète le degré de « trouble » de la solution ou d'opalescence du gel. Cette caractéristique est normalement mesurée à l'aide d'un néphélomètre équipé d'une cellule photo-électrique qui détermine la quantité de lumière diffusée par un gel de 6.67% de concentration contenu dans un tube à essai éclairé selon un axe.
- L'odeur et le goût : il n'existe pas de méthode de contrôle de l'odeur et du goût. Le faible goût caractéristique de la gélatine sera pratiquement éliminé dans tous les secteurs d'utilisation par les autres agents de sapidité et de goût utilisés dans le produit.
- Les composés inorganiques : la détermination des cendres et de nombreux métaux lourds est exigée par la réglementation. Dans les secteurs pharmaceutiques et photographiques, par exemple, les clients ont souvent besoin de gélatine avec une teneur en cendres très faible.

- Les critères bactériologiques : la gélatine doit correspondre à des critères très précis. En effet elle ne doit pas contenir de germes pathogènes ou toxigènes. De par leur structure, les fibres de collagène sont constituées d'acides aminés libres, très recherchés par les organismes vivants. De plus ces chaînes sont linéaires, et donc très accessibles à tous les organismes microscopiques (bactéries, moisissures) qui sont capables de dégrader les fibres de gélatine pour se nourrir en acides aminés. Les bactéries peuvent rapidement dégrader la gélatine, à tel point qu'elle ne forme plus de gel. La dégradation des solutions et des gels de gélatine par des bactéries, des levures et des moisissures peut être inhibée par l'utilisation de conservateurs. La sélection du conservateur variera selon que le produit sera utilisé de façon interne ou externe.

V. La gélatine

A. Structure et Composition

La structure primaire est semblable à celle du collagène. L'analyse de la variation de la composition en acides aminés des gélatines en fonction du prétraitement (Tableau 4), montre d'une manière générale, que le prétraitement acide modifie peu la composition en acides aminés de la gélatine par rapport au collagène dont elle dérive et que le prétraitement alcalin transforme les résidus asparagine et glutamine en acides aspartique et glutamique.

Tableau 4: Comparaison des compositions types en acides aminés des gélatines de type A, de type B et du collagène; exprimées en résidus pour 1000 résidus d'acides aminés (Rose, P.I., Gelatin in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 1987)

| Classes d'acides aminés | Acides aminés | Gélatine type A | Gélatine type B | Collagène (Type I) |
|-------------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| R Hydrophobe | Alanine | 112 | 117 | 114 |
| | Hydroxyproline | 91 | 93 | 104 |
| | Isoleucine | 10 | 11 | 11 |
| | Leucine | 24 | 24,3 | 24 |
| | Méthionine | 3,6 | 3,9 | 5,7 |
| | Phénylalanine | 14 | 14 | 13 |
| | Proline | 132 | 124 | 115 |
| | Tryptophane | - | - | - |
| | Valine | 26 | 22 | 22 |
| R polaire non chargé | Glycine | 330 | 335 | 332 |
| | Asparagine | 16 | 0 | 16 |
| | Glutamine | 25 | 0 | 25 |
| | Sérine | 35 | 33 | 35 |
| | Thréonine | 18 | 18 | 17 |
| | Cystéine | - | - | - |
| | Tyrosine | 2,6 | 1,2 | 4,4 |
| R Chargé > 0 | Arginine | 49 | 48 | 51 |
| | Histidine | 4 | 4,2 | 4,4 |
| | Hydroxylysine | 6,4 | 4,3 | 5,4 |
| | Lysine | 27 | 28 | 28 |
| R Chargé < 0 | Acide Aspartique | 29 | 46 | 29 |
| | Acide Glutamique | 48 | 72 | 48 |

On peut constater que la gélatine est composée d'un certain nombre d'acides aminés hydrophobes (proline, leucine) et hydrophiles (sérine, arginine, etc), qui lui confèrent un caractère amphiphile.

La structure secondaire : selon l'origine de la matière première et le type de traitement qui lui est appliqué, la dénaturation du tropocollagène en gélatine peut fournir trois types de molécules. Les chaînes α_1 et α_2 , les chaînes β qui sont issues de l'association entre une chaîne α_1 et une chaîne α_2 (β_{11} ; β_{12}) ; et des chaînes γ , oligomères de 3 chaînes α (γ_{112}). Les chaînes α , β et γ se différencient par leurs masses moléculaires moyennes respectives de 100 000, 200 000 et 300 000 g.mol⁻¹ (Figure 8). Ceci donne lieu à un mélange de fragments de différents poids moléculaires.

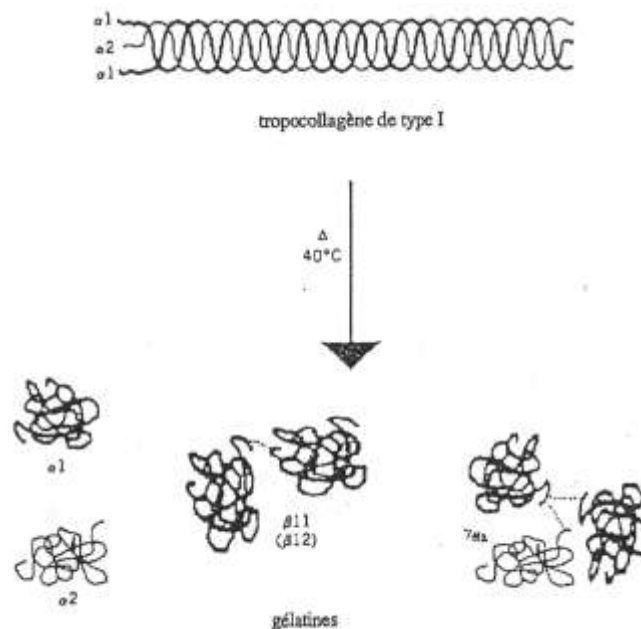


Figure 8: Produits de la dépolymérisation du collagène (d'après Rose, 1987)

L'objectif des fabricants de gélatine est de contrôler l'hydrolyse du collagène, afin d'obtenir la distribution idéale en masse moléculaire pour l'application envisagée. Comme on peut le voir sur la *Figure 9*, suivant le type d'hydrolyse et le bouillon, la distribution en masse moléculaire sera différente.

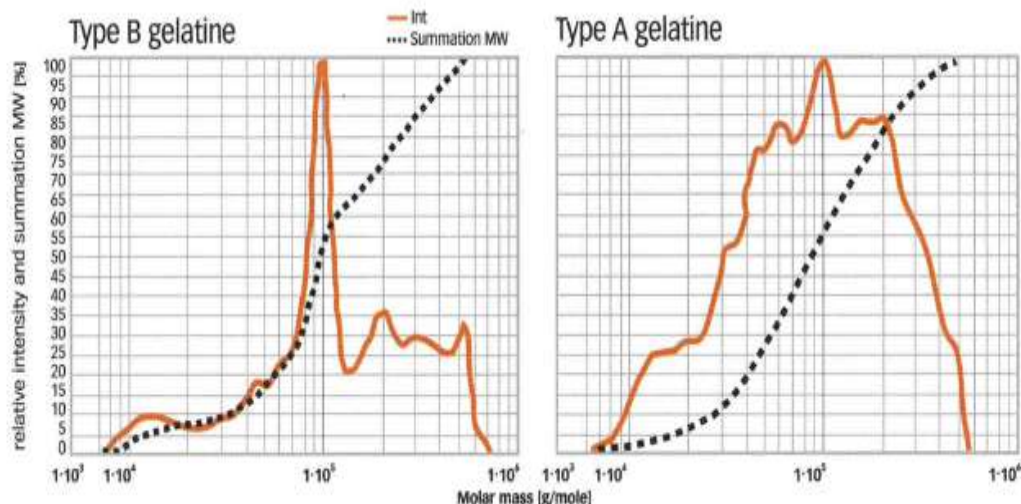


Figure 9: Distribution typique en masse moléculaire des gélatines de type A et B (Gelatin Handbook).

Dans le cas des gélatines de type B, issues d'une hydrolyse alcaline, la majeure partie des fractions est située dans la zone de $100\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, correspondant ainsi à une majorité de chaînes α . Dans le cas des gélatines de type A, issues de l'hydrolyse acide, la distribution en masses moléculaire est plus hétérogène que celle des gélatines de type B. Ces différences sont plus imputables au prétraitement qu'à la source de collagène (Rose, 1987).

Comme la gélatine est un produit de dégradation du collagène, elle est par essence hétérogène et se compose donc d'une large gamme d'espèces moléculaires. D'une manière générale, les gélatines ont une masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) comprise entre 50 et $100\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, et une masse moléculaire moyenne en masse (M_w) comprise entre 100 et $1\,000\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, avec un indice de polydispersité I_p (M_w/M_n) souvent supérieur à 2, dû à l'hétérogénéité même de la gélatine (Wiley, Gelatin Handbook).

B. La gélatine en solution

La gélatine se présente sous forme de grains, qui une fois mis dans l'eau se mettent à gonfler. Pour que la gélatine soit solubilisée, il est nécessaire de la chauffer à des températures supérieures à 40°C .

- Pour des températures supérieures à 40°C , la gélatine présente une structure dite désordonnée, dans laquelle on retrouve en solution, un mélange de différentes

fractions α , β , γ en conformation de pelotes statiques. Le système ainsi obtenu est une solution de gélatine, on dira également que la gélatine est à l'état sol (Bigi *et al.*, 2004).

- Si l'on refroidit une solution de gélatine, un phénomène de gélification se met alors en place. Il s'agit là d'une des principales raisons de l'utilisation de la gélatine par les industriels.

La gélification traduit une transition conformationnelle, c'est-à-dire le passage de l'état désordonné (pelote statistique) à l'état ordonné (hélice gauche). Il peut être suivi par la mesure du pouvoir rotatoire qui détecte l'apparition ou la disparition des hélices gauches. Les mesures sont généralement traduites en taux d'hélices, χ .

$$\chi = \frac{[\alpha]_{\lambda,T} - [\alpha]_{\lambda,T}^{pelote}}{[\alpha]_{\lambda,T}^{collagène} - [\alpha]_{\lambda,T}^{pelote}}$$

Avec $[\alpha]_{\lambda,T}^{collagène}$ la valeur spécifique de l'état natif du collagène, donc 100 % d'hélice et $[\alpha]_{\lambda,T}^{pelote}$ la valeur correspondant à 0% d'hélice.

Le phénomène de gélification se traduit par une renaturation partielle des triples hélices de collagène (*Figure 10*), dépendant de la concentration initiale en gélatine et de la vitesse de refroidissement. Pour de très faibles concentrations ($C \sim 0,01\%$ en poids), la transition pelote-hélice se fait par repliement de la chaîne sur elle-même due à une prédominance de liaisons intramoléculaires. A des concentrations supérieures à 0,1%, la transition implique une agrégation des chaînes par formation de triples hélices interchaînes. (Djabourov *et al.*, 1985)

Concernant la température, plus les solutions sont refroidies brutalement, plus le pourcentage de boucles et de repliement des chaînes serait important (Harrington & Rao, 1970).

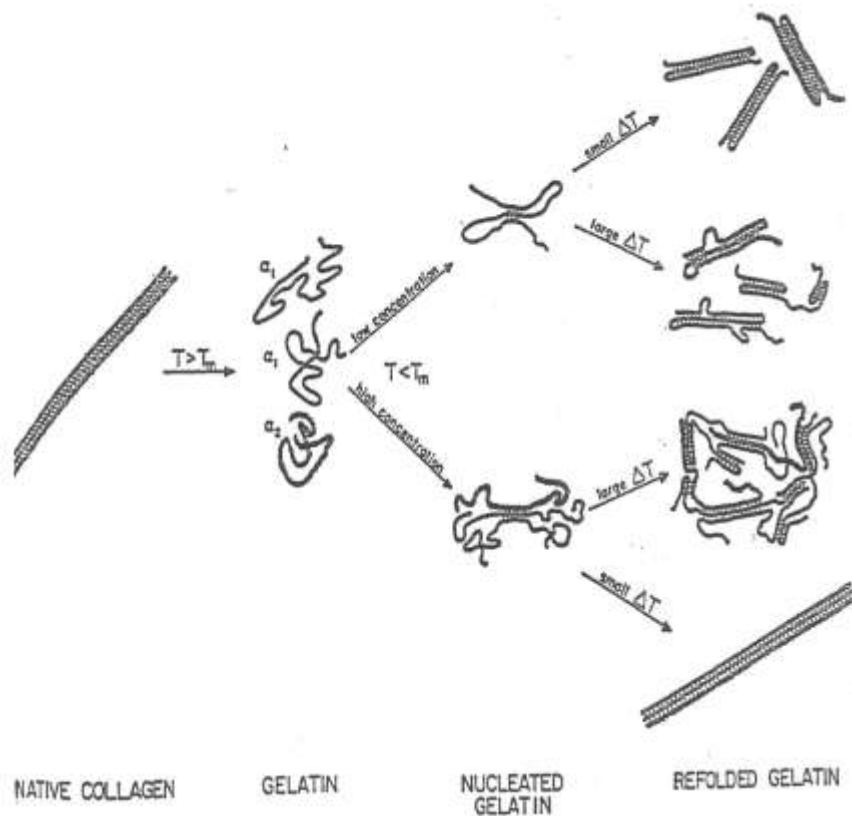


Figure 10: Schéma de renaturation de la gélatine (Harrington et Rao, 1970)

Le changement de conformation observé dans les solutions de gélatine lui confère des propriétés bien spécifiques, que nous allons maintenant aborder.

C. Propriétés technologiques et caractéristiques de la gélatine

Le comportement physico-chimique de la gélatine est principalement déterminé par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, sa distribution en masses moléculaires, ainsi que par les conditions du milieu (pH, force ionique et la réaction avec d'autres composés). Les propriétés de la gélatine peuvent être divisées en deux groupes. Le premier associé aux propriétés gélifiantes de la gélatine (force en gel, viscosité, etc.) et le second plutôt lié aux propriétés de surface de la gélatine.

- Les propriétés associées à la gélification sont principalement la formation du gel, la texturation, et l'effet épaississant. Ces propriétés sont reliées principalement à la viscosité, à la structure, à la masse moléculaire et à la température du système. Le

refroidissement d'une solution de gélatine conduit à la formation d'un gel réversible. Cette réversibilité théoriquement illimitée du processus de gélification est de loin la plus importante propriété technologique de la gélatine.

- Les propriétés de surface sont basées sur le fait que les chaînes latérales de la gélatine, comme celles de toutes les protéines, ont des groupements chargés et que certaines parties des séquences aminés de la molécule, contiennent des acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Les deux parties hydrophile et hydrophobe ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse. Dans le même temps, la gélatine a plusieurs propriétés qui protègent et stabilisent la surface formée. Cette propriété multifonctionnelle de la gélatine est utilisée dans la production et la stabilisation des mousses et émulsions.

La gélatine forme des **solutions colloïdales** avec l'eau, solution dans laquelle le solvant est un liquide et le soluté un solide dispersé de manière homogène sous forme de très fines particules, la préparation étant soit un sol, soit un gel. Elle est donc un « hydrocolloïde ». Ces derniers sont souvent utilisés dans l'industrie alimentaire pour leurs fonctionnalités. Toutefois, un hydrocolloïde seul, est incapable de remplir, toutes les fonctions désirées, mais en comparaison avec celles d'autres hydrocolloïdes (alginates, carraghénanes, etc.), les fonctions de la gélatine sont beaucoup plus larges (pouvoir gélifiant, épaississant).

VI. Applications

La gélatine possède des qualités particulières recherchées par l'industrie pour obtenir des textures spécifiques. La propriété « gélifiante » de la gélatine est la plus connue et la plus utilisée. Le marché de la gélatine se caractérise par l'existence de trois segments essentiels : alimentaire, photographique et pharmaceutique,

A. Industrie alimentaire et photographique

Dans la production alimentaire moderne, la principale propriété utilisée est sa capacité unique à réagir à la chaleur : la gélatine fond à 37°C, la température du corps, puis

redevient ferme en refroidissant. Sa texture agréable et son fondant en bouche en font un ingrédient irremplaçable. De nombreux produits allégés ou pauvres en matières grasses n'existeraient pas sans la gélatine. Elle est ainsi par exemple présente dans la margarine ou le beurre allégé, les pâtes à tartiner ou les fromages à taux réduit en matières grasses. La gélatine est sans goût, lie de grandes quantités d'eau, forme des gels et procure une agréable sensation en bouche. La gélatine alimentaire est indispensable dans de nombreuses confiseries, telles que les bonbons gélifiés (ours, gomme), les caramels mous, les guimauves et les marshmallows, les meringues, les réglisses, etc. Elle leur confère une grande élasticité, une consistance optimale pour la mastication et améliore leur durée de conservation. C'est la gélatine qui donne aux terrines et aux aspics leur apparence si appétissante. De nombreuses variétés de salamis ou de saucissons au poivre sont protégées contre le dessèchement par un film de gélatine. En poissonnerie, la gélatine est surtout employée pour la fabrication de produits en gelée. Outre ses fonctions esthétiques, la gélatine protège de la lumière et de l'oxygène. Sa capacité à fondre à la température du corps en fait un substitut indispensable aux matières grasses dans les aliments allégés.

Les produits photographiques à base de sels d'argent sont constitués de plusieurs couches de gélatine (jusqu'à 15) qui sont coulées sur film ou sur papier. La gélatine est utilisée comme liant pour les sels d'argent hautement photosensibles. Son pouvoir gonflant permet aux produits de développement de pénétrer dans les couches sensibles et d'en être éliminés par lavage. La gélatine constitue un élément important dans le procédé complexe de la technique des couches. Elle présente la particularité de pouvoir se solubiliser à chaud et de former un gel en refroidissant, gel que l'élimination de l'eau permet de rendre permanent. Les propriétés de la gélatine sont à la base de la production de films photographiques ultrasensibles, en particulier pour atteindre sur les films couleur et radiographiques, le haut degré de sensibilité requis. La gélatine est également indispensable pour la photographie numérique. Les papiers pour imprimantes à jet d'encre enduits de gélatine, assurent la brillance des couleurs et la netteté des contours, permettant des impressions d'excellente qualité. Aujourd'hui le secteur photographique est un secteur qui connaît un certain déclin, en raison notamment de la forte progression du numérique.

B. Industrie pharmaceutique

Dans l'industrie pharmaceutique, la gélatine est utilisée pour la fabrication des gélules et des capsules. Elle protège les médicaments des effets néfastes de la lumière et de l'oxygène. Les gélules sont essentiellement employées pour les médicaments liquides, alors que les capsules sont utilisées pour les poudres. La gélatine permet de lier les principes actifs du médicament et de prolonger leur durée de conservation. Grâce à une sélection et un dosage rigoureux, la gélatine peut même influencer sur la vitesse de libération des principes actifs, soit en l'accéléralant, soit en la ralentissant (effet « retard »). Les comprimés enrobés de gélatine représentent un nouveau progrès technologique, l'enrobage de gélatine facilitant l'ingestion du comprimé par les patients.

C. Les films de gélatine

Le pouvoir filmogène de la gélatine est une propriété importante, très utilisée dans l'industrie pharmaceutique. En effet la gélatine est capable de former un film résistant, transparent, flexible, qui peut se dissoudre facilement et qui entre directement dans la formulation des capsules de médicaments. La formation des films de gélatine se fait par le couchage d'une solution de gélatine concentrée sur une surface plane (plaque en verre), ou destinée à donner sa forme à la capsule, puis le passage de l'état sol à l'état gel. L'épaisseur du film est comprise entre 80 et 150 μm pour les capsules dures, entre 250 et 500 μm pour les capsules molles.

Dans l'industrie pharmaceutique, les gélatines utilisées dans la formulation des capsules sont des mélanges de gélatine de différents types et origines, afin d'obtenir des propriétés bien spécifiques (force en gel, viscosité, etc.). Ces mélanges donnent des gélatines de plus ou moins bonne qualité. Pour caractériser ces mélanges, des tests de la pharmacopée plus stricts ont été mis au point, notamment sur les capsules et les films issus de gélatine.

Ces tests ont mis en évidence, une augmentation du nombre de problèmes liés à la solubilité des capsules. Très récemment, des études ont montré qu'une conservation dans des conditions élevées d'humidité et de température, et/ou la présence de composés réactifs (aldéhydes) issus de la dégradation d'excipients dans la gélule, provoquent un phénomène de réticulation de la gélatine (Meyer *et al.*, 2000 ; Chafetz *et al.*, 1984). Ce phénomène induit la formation d'une pellicule insoluble autour de l'enveloppe de la gélule limitant la libération du principe actif contenu à l'intérieur (Carstensen & Rhodes, 1993). La réticulation de la gélatine conduit à un

réseau complexe de haut poids moléculaire qui produit un hydrogel gonflé par l'eau. Ce phénomène réduit considérablement, voire empêche, la dissolution de la gélatine, qui serait due à la formation de liaisons interchaînes, de types amides (Yannas & Tobolsky, 1967 ; Mwangi & Ofner, 1995).

VII. Mécanismes à l'origine de la Réticulation

La réticulation de la gélatine est un phénomène bien connu qui peut se produire par une ou plusieurs réactions chimiques (Marks *et al.*, 1968). L'étude de la réticulation sur films de gélatine a fait l'objet de nombreuses études, notamment par l'ajout d'agents réticulant (Glutaraldéhyde, formaldéhyde, etc.). Ces réactions chimiques (naturelles ou provoquées) semblent être dues principalement aux groupements aminés libres présents dans la gélatine, notamment le groupement aminé de la lysine, qui jouerait un rôle dans les réticulations intra et intermoléculaires entre les chaînes de gélatine. Il est admis que les groupements aminés issus des résidus histidine joueraient un rôle beaucoup moins important que les groupements aminés issus de la lysine dans les phénomènes de réticulation (Jones, 1987). Le groupement guanidine de l'arginine est sous forme cationique à pH neutre, et donc non réactif, sauf si un pH très élevé est utilisé (Jones, 1987). Les groupements carboxyliques, beaucoup plus nombreux, sont moins impliqués dans les réactions chimiques de la gélatine. Trois principales réactions semblent donc être impliquées dans les phénomènes de réticulation.

A. Réaction de désamination oxydative

Une des premières réactions naturelles décrites dans la littérature et susceptible de former des réticulations, notamment dans les films de gélatine, est la réaction dite de désamination oxydative. Elle serait impliquée dans le vieillissement des tissus vivants dont les manifestations sont par exemple la formation d'une peau ridée (Bailey, 1991). Des résidus lysine proches les uns des autres peuvent subir une désamination oxydative et produire des groupements aldéhydes terminaux. Un de ces groupements aldéhyde terminal peut ensuite être attaqué par un groupement aminé d'un autre résidu lysine proche, pour former un résidu imine qui subira ensuite à son tour une série de condensations aldéhydiques pour aboutir à des réticulations contenant un anneau pyridinium, comme le montre la

Figure 11 (Franzblau, 1971, Digenis *et al.*, 1994).

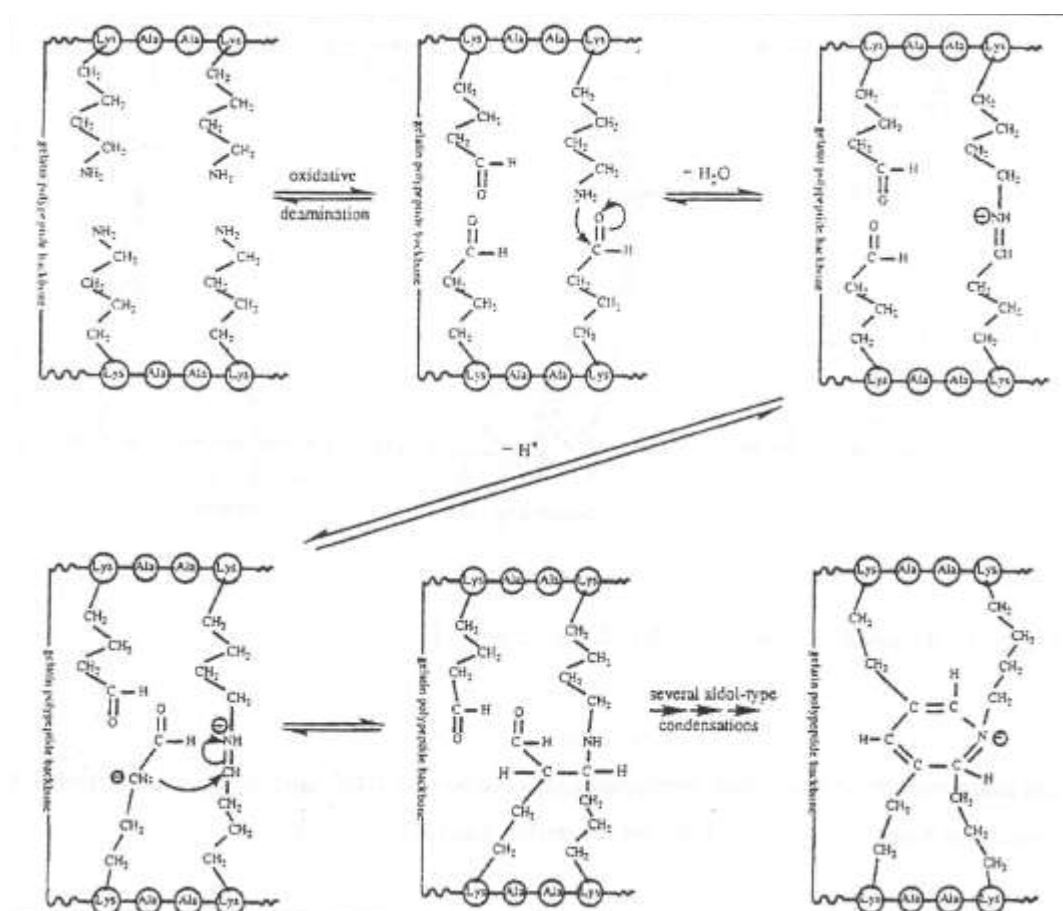


Figure 11: Mécanisme de désamination oxydative (Digenis et al., 1994)

B. Réaction avec les sucres

Le glucose, le galactose ainsi que d'autres sucres sont souvent inclus dans la formulation des médicaments, mais sont aussi présents naturellement en très faible quantité dans le collagène. La quantité varie fortement non seulement entre les différentes espèces mais aussi dans certains cas, entre les différents tissus chez le même animal. Ainsi, dans les collagènes de mammifères, la teneur en glucides varie de 0.4% dans la peau à 4% dans les cartilages et jusqu'à 12.6% dans les muscles (Bornstein & Traub, 1979). Des sucres qui jouent un rôle dans la structure du collagène. La réaction entre des sucres et des fonctions amines libres a fait l'objet de nombreuses publications (Cortesi *et al.*, 1998 ; Friedman, 1982). Une des réactions très connue est la « réaction de Maillard » qui se fait entre le groupement carbonyle d'un sucre et la fonction amine libre d'un acide aminé, et qui se

traduit notamment par un brunissement (Biemel *et al.*, 2001). Ces réactions peuvent conduire à une réticulation (*Figure 12*) et diminuer la solubilité de la gélatine (Jakson *et al.*, 1965).

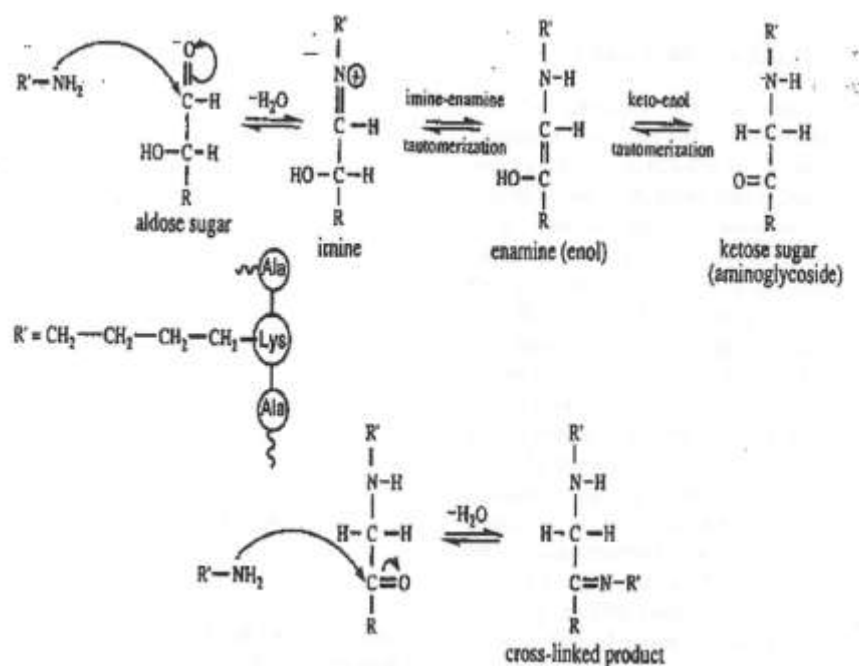


Figure 12 : Réaction d'une amine avec un sucre (Digenis *et al.*, 1994)

La fonction aldéhyde du sucre peut réagir avec la fonction ε -amine libre, notamment de la lysine, pour former un intermédiaire imine qui, par des réarrangements dit d'Amadori, permet d'obtenir un sucre cétose. Le cétose libre, par sa fonction carbonyle, peut réagir avec une autre amine libre et réticuler ainsi la gélatine.

C. Réaction avec des composés aldéhydiques

La gélatine est capable d'interagir chimiquement par certains de ces acides aminés comme la lysine, avec des composés aldéhydiques. La réactivité des fonctions amines avec les composés aldéhydiques a été étudiée pendant une longue période, d'une part pour améliorer certaines caractéristiques des films photographiques et pharmaceutiques et, d'autre part, pour cibler les applications innovantes comme les bioadhésifs et les capsules à libération contrôlée. Le formaldéhyde est le principal agent réticulant utilisé, il présente une forte réactivité (Fraenkel-Conrat *et al.*, 1945 ; French & Edsall, 1945) et permet de diminuer la solubilité des capsules de gélatine.

La réaction chimique entre la lysine et le formaldéhyde aboutit dans un premier lieu à la formation d'un « hémiaminal » dont la vitesse de formation est limitée à pH acide. La perte

d'une molécule d'eau aboutit à la formation d'une imine. Cette imine peut réagir à son tour avec une amine libre et former ainsi une liaison aminal qui est réversible à pH acide (Cordes & Jencks, 1962 ; Koehler *et al.*, 1964) (Figure 13).

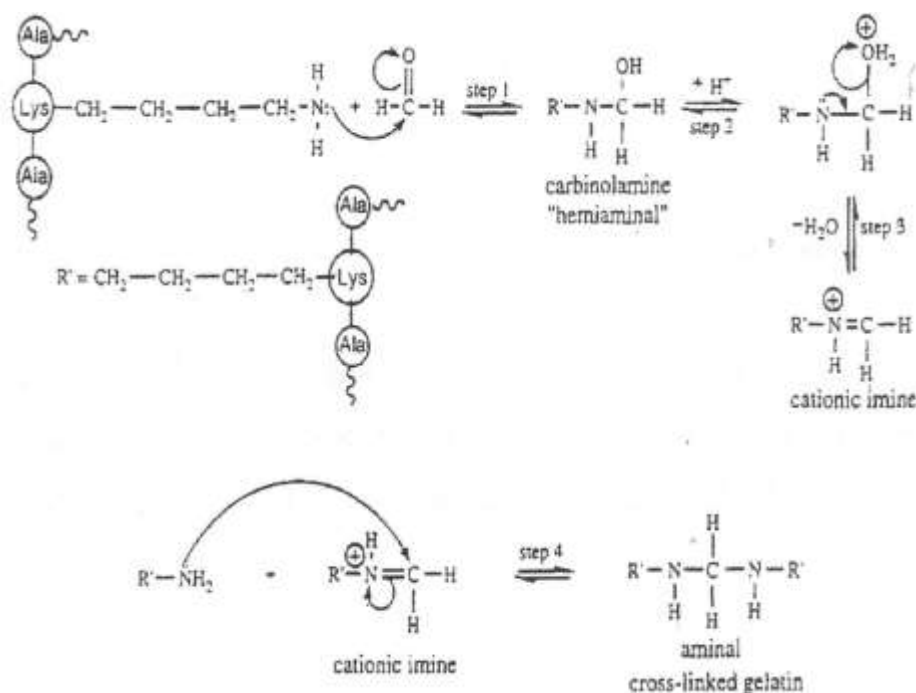


Figure 13 : Action du Formaldéhyde (Digenis *et al.* 1994)

Cette réticulation est volontairement utilisée par les industriels, notamment pour fabriquer des gélules gastro-résistantes, mais elle peut apparaître parfois de façon non-désirée. De nombreux stabilisant sont souvent utilisés dans la formulation des capsules dites molles (Polyéthylène glycol, etc.). Ces composés par « auto-oxydation » peuvent former des composés aldéhydiques de hauts poids moléculaires (Doelker & Vial-Bernasconi, 1988 ; Chafetz *et al.*, 1984), pouvant réagir avec la gélatine induisant ainsi des réticulations, non désirées.

D. Influence du taux d'humidité et de la température

Il a souvent été montré que la température et l'humidité pouvaient accentuer le phénomène d'insolubilité, notamment en présence d'agents réticulant (Murthy *et al.*, 1989). De nombreuses études ont montré que des capsules de gélatines préalablement traitées par des agents réticulant, puis stockées à de hautes températures et à des taux d'humidités élevées, présentaient une insolubilité beaucoup plus importante (Ofner *et al.*, 2000). Des études ont montré que des capsules d'hydrochlorothiazide et de dichlorhydrate de

diphenhydramine, stockées dans des conditions d'humidité élevées présentaient une perte de solubilité (Murthy *et al.*, 1989). Le mécanisme de réticulation serait dû à la formation d'un groupement imine catalysée par le pourcentage d'humidité élevé.

Ce phénomène d'insolubilité est d'autant plus problématique s'il se produit en l'absence d'agent réticulant. Or cette perte de solubilité a été observée dans la gélatine, influencée notamment, par l'humidité et la température et aboutissant ainsi à des réticulations naturelles.

Une étude a montré que l'exposition de films de gélatine à des températures élevées (entre 65 et 105°C) conduisaient à une insolubilité qui s'explique par la formation d'un réseau tridimensionnel résultant d'une réticulation interchaînes (Yannas & Tobolsky, 1967). Marks *et al.*, (1968) ont mis au point un « vieillissement accéléré » de la gélatine qui permet de recréer l'insolubilité, observée notamment, sur les films de gélatine. La technique consiste à stocker de la gélatine en grain dans une étuve ventilée à 75°C pendant quelques jours. Ils ont observé une perte de la solubilité de la gélatine en solution, qu'ils pensent être dus à une polymérisation et/ou une agrégation des chaînes probablement par réticulation et/ou formation de liaisons hydrogènes.

La réticulation, qu'elle soit naturelle ou non, doit induire une augmentation de la masse moléculaire de la gélatine (Doelker & Vial-Bernasconi, 1988), d'où l'intérêt d'avoir un outil analytique qui permet d'évaluer et d'observer son évolution, plus particulièrement après un stockage dans des conditions favorisant la perte de solubilité. Le travail que nous présentons dans le chapitre suivant a ainsi pour objectif d'évaluer la masse moléculaire de la gélatine en utilisant pour cela un outil analytique différent, l'AFIFFF-MALS, qui permet d'avoir une vision plus globale de la distribution moléculaire de la gélatine en solution.

Chapitre II. Analyse de la gélatine par AFIFFF-MALS

I. Introduction

Les propriétés fonctionnelles des biopolymères dépendent fortement de leurs masses moléculaires (Farahnaky *et al.*, 2003). Certaines conditions de stockage, de traitements thermiques, ou autres, peuvent parfois altérer la masse moléculaire du biopolymère, induisant une diminution des propriétés fonctionnelles désirées, d'où l'intérêt de la déterminer de façon précise.

La gélatine est connue comme étant un mélange hétérogène de polypeptides et de protéines de masse moléculaire comprise entre 100 000 et plus d'un million g.mol^{-1} (Stainsby, 1977). Cette masse a été déterminée par des techniques analytiques très variées telles que la viscosimétrie (Veis, 1964), l'électrophorèse sur gel (Melia, 1983), la diffusion de la lumière (Boedtker & Doty, 1954 ; Stejskal *et al.*, 1986) par exemple.

L'estimation de la masse moléculaire dans les solutions de gélatine est principalement réalisée par « Chromatographie d'Exclusion Stérique » (SEC), technique utilisée comme procédé de contrôle durant le développement du produit. Elle nécessite d'établir une ou plusieurs courbes d'étalonnage indiquant la masse moléculaire en fonction du temps de rétention des macromolécules. Couplée à une détection multiangulaire laser (MALS), la SEC permet d'avoir une estimation absolue des masses moléculaires dans les solutions de gélatine. Les trois chaînes protéiques principalement déterminées sont les chaînes α , les chaînes β qui sont issues de l'association des chaînes α ; et les chaînes γ , oligomères de 3 chaînes α (Kühn, 1987). Elles se différencient par leurs masses moléculaires moyennes respectives de 100, 200 et $300.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ (Piez, 1967 ; Boedtker & Doty, 1956). Meyer et Morgenstern (2003) ont observé par SEC-MALS dans les solutions de gélatine, l'existence de particules de très hauts poids moléculaires, qui résulteraient d'une agrégation des chaînes et dont la masse n'a pu être calculée en raison de la limite d'exclusion.

Les techniques d'exclusion SEC ne permettent donc pas d'avoir une estimation de la masse molaire des molécules de très hauts poids moléculaires issues de l'agrégation des chaînes contenues dans les solutions de gélatine. En effet, l'utilisation d'une telle technique a deux principales limites : celle d'induire des forces de cisaillement importantes sur les molécules par l'utilisation d'une phase stationnaire, mais également d'éluer les molécules de très hauts poids moléculaire dans le volume d'exclusion de la colonne (Viebke & Williams, 2000). Il est cependant important de déterminer de façon exacte la masse moléculaire de ces fractions

protéiques de hauts poids moléculaires, car elles peuvent avoir une influence sur les propriétés fonctionnelles de la gélatine.

Récemment, une étude par AFIFFF-MALS (Fraunhofer *et al.*, 2004) d'une solution de gélatine, a permis d'estimer la masse moléculaire de celle-ci entre 1.10^4 et 1.10^7 g.mol⁻¹, alors que par SEC-MALS, la masse moléculaire a été évalué à moins de 1.10^6 g.mol⁻¹ pour la même gélatine. Cette différence s'explique par l'utilisation d'une technique de séparation plus douce, qui permet contrairement à la SEC, de préserver les agrégats et de pouvoir estimer leur masse moléculaire. L'utilisation de colonne en SEC conduirait à une dégradation des agrégats due aux forces de cisaillement exercées par la colonne, conduisant alors à une mauvaise interprétation des données (Viedke & Williams, 2000).

Nous nous proposons donc dans ce chapitre d'estimer la distribution en masse moléculaire d'une solution de gélatine par AFIFFF-MALS et de montrer en quoi cette technique peut être complémentaire des techniques traditionnellement utilisées, notamment dans la recherche des produits de réticulation et des produits de haute masse moléculaire.

II. L'Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AFIFFF)

Les méthodes dites de Fractionnement par Flux Force (FFF), sont des techniques assez nouvelles, dédiées principalement à la caractérisation des macromolécules. Décrites pour la première fois en 1960 par Giddings, les techniques de fractionnement par flux-force, sont basées sur l'action simultanée de l'écoulement d'un liquide dans un canal de faible épaisseur et l'effet d'un champ externe appliqué perpendiculairement au canal. Le champ d'application de ces techniques est très large, avec une étendue en taille allant du submicronique à des particules de plus de 100 μm . Différentes techniques de fractionnement sont aujourd'hui décrites, qui diffèrent selon le champ externe appliqué :

- Sedimentation FFF : Fractionnement par couplage Flux Force de Sédimentation (SdFFF), qui est une technique qui utilise la force centrifuge comme champ externe, très utilisé dans la caractérisation des particules colloïdales dont le diamètre est compris entre 0.05 et 1 μm (Giddings & Ho, 1995 ; Kirkland & Yau, 1983).
- Thermal FFF (ThFFF) : cette technique est généralement utilisée pour analyser les polymères synthétiques dans les solvants organiques. Elle est basée sur l'utilisation d'un gradient de température établit par chauffage d'une plaque d'un côté et le refroidissement de l'autre du canal (Liu & Giddings, 1992).
- Electrical FFF (EIFFF) : elle combine les avantages de l'électrophorèse et de la séparation par Flux Force. Elle utilise un champ électrique comme champ externe et permet ainsi de séparer les molécules en fonction de leur taille, mais également en fonction de leur nature électrostatique (Caldwell & Gao, 1993).
- Flow FFF (FIFFF) : technique la plus universelle, dans laquelle le champ de force appliqué est un flux croisé perpendiculaire au flux d'élution. Permet de séparer les molécules très petites (500 Da) jusqu'aux particules de 100 μm de diamètre (Beckett *et al.*, 1989 ; Liu & Giddings, 1991 ; Liu *et al.*, 1993).

Parmi l'ensemble des techniques de fractionnement dites de FIFFF, on retrouve l'AFIFFF qui est certainement l'une des techniques de FFF les plus universelles. Sa gamme d'application couvre des macromolécules, simples ou complexes, d'importance biologique, pharmaceutique, industrielle ou environnementale. Le fractionnement des protéines par AFIFFF est basé sur une séparation en fonction de leur rayon hydrodynamique.

Le système de fractionnement par AFIFFF est constitué d'une cellule de séparation dite asymétrique (Figure 14), à travers laquelle un flux d'élution est appliqué. La cellule est constituée d'un bloc supérieur imperméable et d'un bloc inférieur doté d'un fritté :

- une membrane d'ultrafiltration, généralement de 5 ou 10 kDa, est déposée sur le fritté à travers lequel une fraction de l'éluant introduit dans la cellule va pouvoir être soutiré. Elle détermine la limite inférieure de taille des échantillons (membranes en cellulose régénérée, en polyethersulfones, etc.).
- un spacer (espaceur) qui est une fine lamelle de forme trapézoïdale, déposée sur la membrane et serrée entre deux blocs. L'épaisseur de cette pièce fixe le volume de la zone de fractionnement, l'épaisseur varie entre 125 et 490 μm .

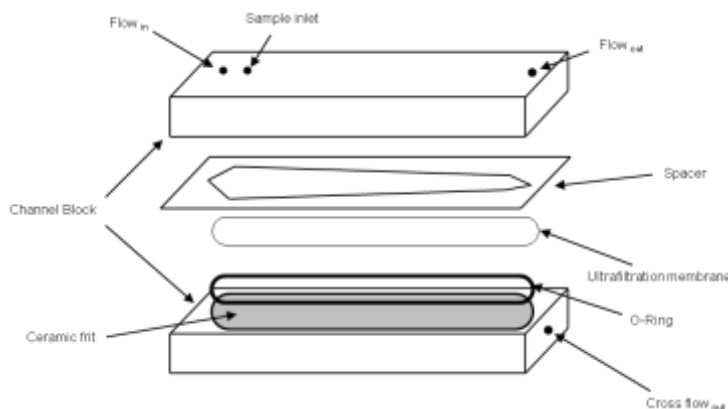


Figure 14: Représentation schématique d'une cellule AFIFFF (Rbii et al., 2009)

Par rapport aux techniques d'exclusion stérique, ce système présente les avantages d'une adsorption minime des molécules due à la surface de contact limitée, et d'un cisaillement négligeable des molécules du fait de l'absence de phase stationnaire.

Les constituants de l'échantillon sont séparés par l'application d'un champ de force perpendiculaire à la direction d'élution, dit flux croisé d'éluant. En mode normale, mode fréquemment observé, la séparation se fait selon la Figure 15. Or un mode différent du mode normal peu apparaitre, le mode stérique, qui a lieu à partir d'une certaine taille ($>1\mu\text{m}$) et dans lequel les molécules de grosses tailles sont éluées avant les petites.

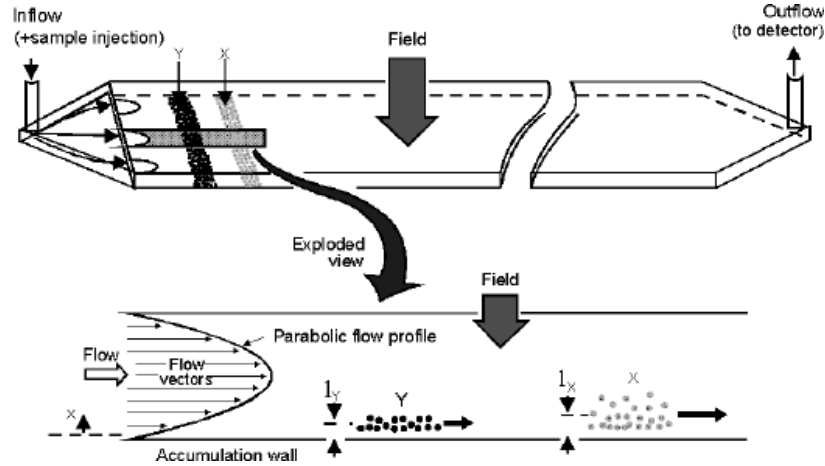


Figure 15: Représentation schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule
(Christoph Wabel, 1998)

L'échantillon injecté dans la cellule est soumis au flux croisé de débit V_c , et au mouvement Brownien, qui est fonction du coefficient de diffusion D des molécules dans l'éluant. Lors des phases de concentration et de relaxation des échantillons, les molécules se répartissent sur un même plan à proximité de la membrane. Les plus grosses, à plus petit coefficient de diffusion, sont plus proches de la membrane, et les plus petites, à coefficient de diffusion plus élevé, en sont plus éloignées. Lors de la phase d'élution, l'épaisseur de la cellule étant très faible (de 125 à 490 μm), le régime est laminaire et le profil de vitesse parabolique. Le temps de rétention t_R s'écrit en fonction du coefficient de diffusion :

$$t_R = \frac{t^0 \cdot V_c \cdot w^2}{6 \cdot V^0 \cdot D} \quad (1)$$

avec t_R le temps de rétention du composé, t^0 le temps mort correspondant à la traversée du volume de la cellule, V^0 le volume de la cellule, w l'épaisseur de la cellule, D le coefficient de diffusion, et V_c le débit de flux croisé.

Or ce coefficient de diffusion peut s'écrire en fonction du rayon hydrodynamique de la molécule d'après l'équation approximée de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (2)$$

où k est la constante de Boltzmann, T la température absolue (K), η la viscosité de l'éluant et r_H le rayon hydrodynamique de la molécule.

Le temps de rétention s'exprime alors en fonction du rayon hydrodynamique de la molécule selon l'équation suivante en mode normal :

$$t_R = \frac{t^0 \cdot Vc \cdot w^2 \cdot \eta \cdot \pi}{V^0 \cdot k \cdot T} \cdot r_H \quad (3)$$

Dans le domaine des biopolymères, l'AFIFFF a notamment permis de caractériser des polysaccharides comme des pullulanes ou des dextrans (Wittgren & Walhund, 1997a), de l'amidon (You *et al.*, 1979; Hanselmann *et al.*, 1995), des celluloses modifiées (Wittgren & Wahlund, 1997a ; Wittgren & Wahlund, 2000), ou encore très récemment la gélatine (Fraunhofer *et al.*, 2004).

Par conséquent, ce fractionnement permet de séparer les constituants d'un échantillon par taille. Le couplage de cette technique avec une détection multiangulaire laser (MALS) permet de déterminer de manière absolue les masses moléculaires et le rayon de giration des molécules.

III. Diffusion de la lumière Multiangulaire (MALS)

Le principe et la théorie de la diffusion multiangulaire sont décrits dans la bibliographie (Wyatt, 1993 ; Zimm, 1948). La théorie de la diffusion de la lumière par détection MALS est la suivante. Une molécule est soumise à un rayonnement électromagnétique, elle se polarise et diffuse cette lumière. La diffusion induite se fait de façon isotrope pour des molécules de diamètre inférieur à un vingtième de la longueur d'onde du rayonnement, et anisotrope pour des molécules plus volumineuses (Figure 16).

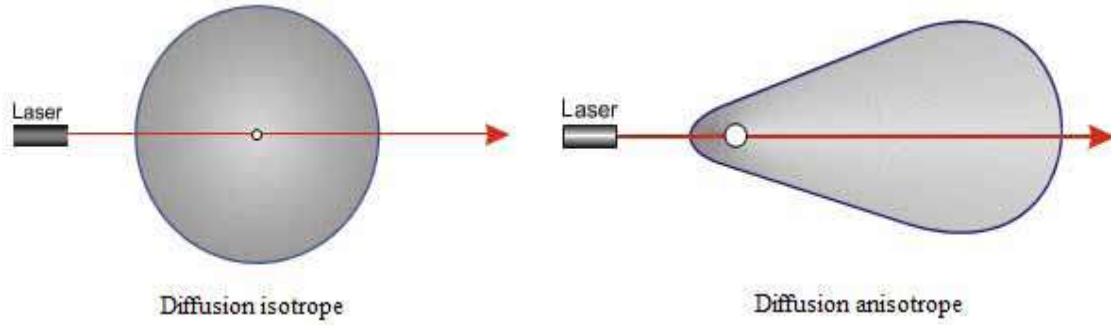


Figure 16: Schéma des types de diffusion de la lumière laser en fonction du volume occupé par la molécule

L'intensité de la lumière diffusée par un échantillon dépend, entre autre, de l'angle d'observation θ , de la masse moléculaire moyenne en masse M_w , et du rayon de giration r_g de la molécule. Une des relations qui existe entre ces paramètres est décrite par l'équation de Zimm (Zimm, 1948):

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 \cdot c \quad (4)$$

où K représente la constante optique, c la concentration de l'échantillon dans la cellule de mesure, M_w la masse moléculaire moyenne en masse, R_θ le rapport d'excès de Rayleigh, $P(\theta)$ le facteur de forme qui exprime l'influence du rayon sur l'intensité du rayon diffusé et A_2 le deuxième coefficient viriel. Le rapport d'excès de Rayleigh R_θ est fonction de l'intensité de la lumière diffusée aux différents angles :

$$R_\theta = \frac{(I_{\theta(BP)} - I_{\theta(S)}) \cdot r_D^2}{I_0 V_0} \quad (5)$$

avec I_θ l'intensité de la lumière diffusée par le soluté en solution (BP) et le solvant (S) à l'angle θ , I_0 l'intensité du rayon incident, r_D la distance séparant le centre de la cellule de mesure et le détecteur et V_0 le volume de la cellule.

Le facteur de forme $P(\theta)$ dépend de la taille et de la forme de la molécule et décrit la dépendance angulaire de l'intensité de la lumière diffusée :

$$P(\theta) = \frac{1}{1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle r_g \rangle^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad (6)$$

Couplée à des techniques de fractionnement comme l'AFIFFF, le système est soumis à des phénomènes de dilution, induisant une concentration c très proche de zéro, permettant ainsi de négliger le terme A_2 . L'équation s'écrit donc :

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} \quad (7)$$

En utilisant la représentation de Zimm Figure 17:

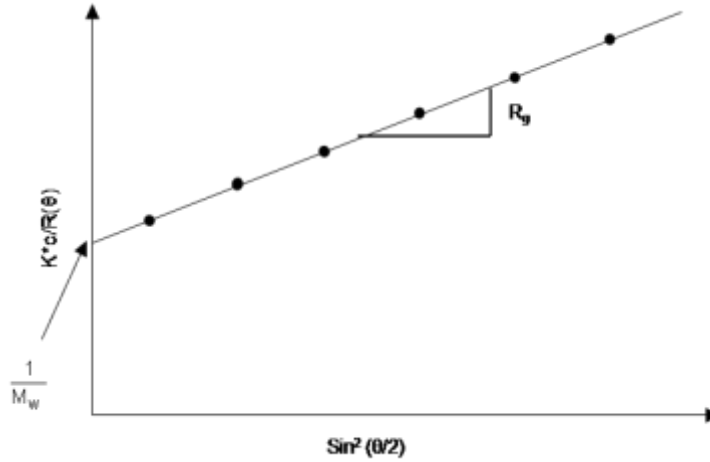


Figure 17: Diagramme de Zimm (Zimm, 1948)

Si on extrapole à l'angle $\theta=0$, la masse moléculaire et le rayon de giration de la molécule peuvent être obtenus à partir de la représentation de Zimm par :

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = f\left(\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)\right) \quad (8)$$

avec la masse moléculaire (M_w) correspondant à la valeur sur l'axe des ordonnées et la valeur de la pente correspond au rayon de giration de la molécule.

Le détecteur MALS couplé à la SEC ou à l'AFIFFF permet d'accéder aux valeurs de masse moléculaire moyenne en nombre (M_n) et en masse (M_w), ainsi qu'à la polymolécularité (I_p), ou polydispersité qui représente la dispersion des masses moléculaires d'une population de molécules. Elles sont obtenues à partir des équations suivantes :

$$M_n = \frac{\sum C_i}{\sum \frac{C_i}{M_i}} \quad (9)$$

$$M_w = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i} \quad (10)$$

$$I_p = \frac{M_w}{M_n} \quad (11)$$

avec M_i la masse moléculaire sur la tranche i et de concentration c_i .

Le rayon de giration peut également être déterminé par le détecteur MALS :

$$r_g = \sqrt{\frac{\sum n_i M_i \langle r^2 \rangle}{\sum n_i M_i}} \quad (12)$$

IV. Analyse de la gélatine par AFIFFF-MALS

L'analyse dite AFFFF-MALS consiste en un fractionnement d'un échantillon, solution de gélatine dans notre étude, suivi de mesures quantitatives par un détecteur ultraviolet (UV) ($\lambda=214$ nm) et de mesures qualitatives par un détecteur multiangulaire laser (MALS).

A. Mise au point de la méthode

L'utilisation de cette technique a nécessité au préalable de déterminer :

- **La nature de l'éluant** utilisé lors de l'analyse : un éluant adéquat, non dénaturant (afin de conserver la structure native de la gélatine en solution) et peu salin, dans lequel la gélatine se solubilise facilement et qui n'influe pas sur l'organisation structurale des différentes fractions protéiques de la gélatine en solution. Le choix s'est porté sur un tampon phosphate à 2mM, de pH 6 et contenant 14 mM de chlorure de sodium (Fraunhofer *et al.*, 2004).
- **La méthode d'analyse** : plusieurs fractogrammes préliminaires ont été nécessaires avant de trouver la méthode qui permettait d'avoir la séparation la mieux adaptée à notre étude pour discriminer les différentes fractions protéiques contenue dans les solutions de gélatine. La méthode qui était la plus pertinente est celle décrite Figure 18:

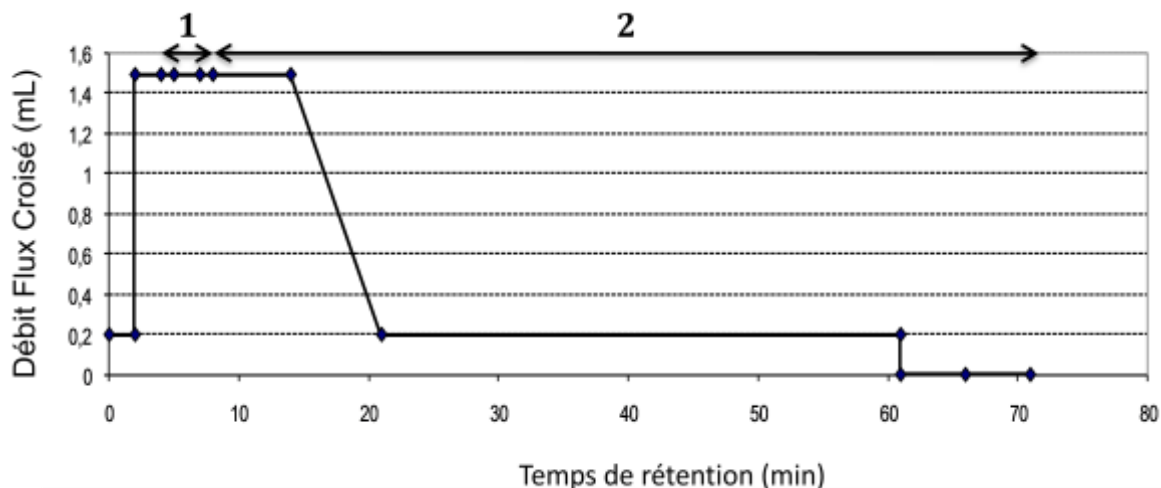


Figure 18: Gradient de Flux Force appliqué : 1 « Focusing » ; 2 Elution

Comme on peut le voir, le fractionnement a été réalisé en utilisant un flux-croisé variable et non iso-force, afin d'avoir une meilleure séparation et une distribution croissante de la masse moléculaire.

- **L'épaisseur du spacer** : le choix de l'épaisseur du spacer est aussi très important puisque le temps de rétention est proportionnel à l'épaisseur de la cellule de fractionnement (w). Dans le cas des solutions de gélatine le choix s'est porté sur un spacer de 250 μm taille Medium, de 19.5 cm de longueur et d'une largeur initiale de 1.65 cm et largeur finale de 0.27 cm.

B. Fractogramme d'une solution de gélatine

L'échantillon de gélatine utilisée dans cette étude est une gélatine de type A, issue de peau de porc, provenant de la société Rousselot S.A.S (Isle sur la Sorgue, France), qui présente une force en gel (Bloom) de 253 g, une viscosité mesurée à 6.67% de 4.62 mPa.s, un point isoélectrique à 9.3 et un taux d'humidité de 11%.

La Figure 19 présente le fractogramme obtenu à partir de cette solution de gélatine, avec le profil UV et MALS, ainsi que l'évolution de la masse moléculaire au cours de l'élution, dans un tampon phosphate à 2mM, pH 6, en présence de 14 mM de NaCl à température ambiante. La distribution croissante de la masse moléculaire au cours de l'élution traduit bien une séparation en mode normal, avec les molécules de plus petites tailles (donc de masses moléculaire plus faibles) qui sortent avant les molécules de plus grosses tailles.

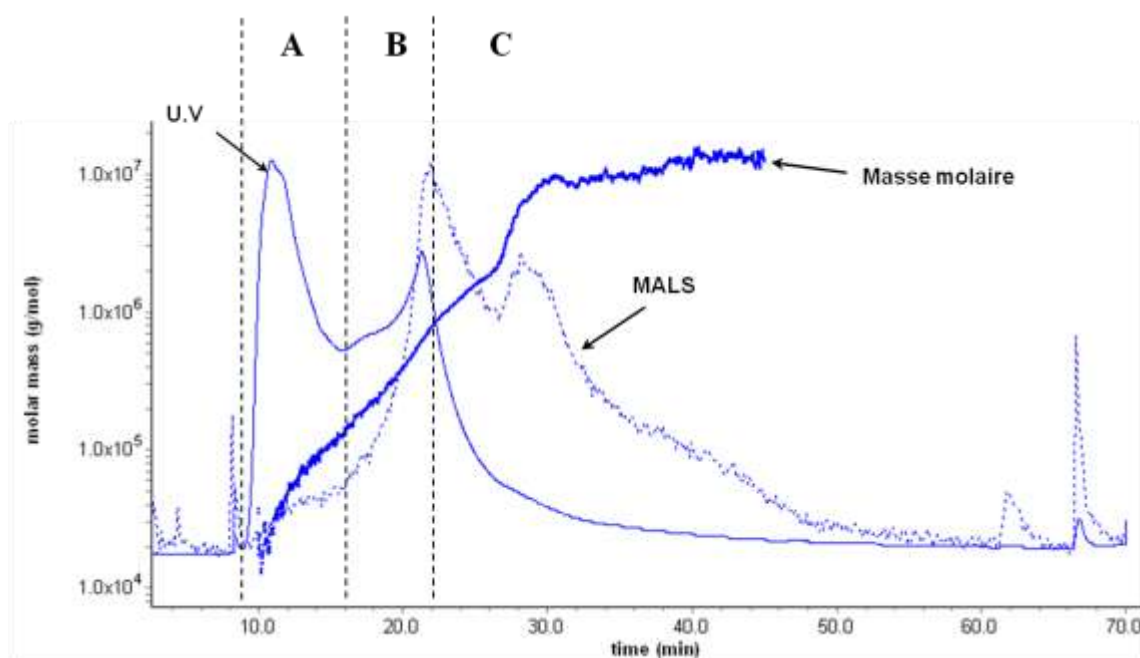


Figure 19: Fractogramme d'une solution de gélatine

Le fractogramme peut être divisé en trois sections :

- (A) : de 8 à 16 min, dans lequel on observe un signal U.V. très intense mais un signal MALS qui répond très peu. Une zone (A) qui traduit la présence de fractions protéiques de petites tailles mais en grande quantité dans la solution de gélatine.
- (B) : entre 16 et 22 min, on observe une réponse assez intense des deux détecteurs UV et MALS. Dans cette zone, les fractions de tailles intermédiaires sont éluées.
- (C) : de 22 à la fin : on peut constater cette fois-ci, que dans cette zone, le signal UV répond très peu, mais que le signal MALS, répond, lui, fortement. Cela s'explique par l'élution des fractions de plus hauts poids moléculaire, mais qui ne sont présente qu'en très faible quantité dans la solution de gélatine analysée.

L'évolution croissante de la masse moléculaire au cours de l'élution, qui traduit bien la séparation en mode normal, est comprise entre $3.10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ et $1.10^7 \text{ g.mol}^{-1}$. Ceci est en accord avec les résultats déjà observé par Fraunhofer *et al.*, (2004), avec un taux de recouvrement de l'ordre de 70% et une polydispersité supérieur à 2. Ces résultats traduisent bien l'hétérogénéité que l'on peut observer dans une solution de gélatine.

C. Identification des différentes fractions

Comme nous l'avons vu, la gélatine est constituée de différentes fractions protéiques résultant de la dégradation du collagène. Les trois fractions, principalement identifiées dans les solutions de gélatine sont : les chaînes α , les chaînes β qui sont issues de l'association entre les chaînes α ; et des chaînes γ , oligomères de 3 chaînes α (Kühn, 1987). Elles se différencient par leurs masses moléculaires moyennes respectives de $100, 200$ et $300.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ (Piez, 1967 ; Boedtker & Doty, 1956).

De nombreuses techniques ont été utilisées pour déterminer la distribution en masse moléculaire de la gélatine (Viscosimétrie, gel d'électrophorèse, etc). Notamment des techniques de diffusion de lumière couplées à des méthodes séparatives comme la SEC. Récemment, Meyer et Morgenstern (2003) ont étudié la structure et la distribution moléculaire de la gélatine en solution par SEC-MALS. Ils obtiennent, par cette technique, une bonne séparation des chaînes α et β dont ils estiment respectivement la masse moléculaire à 90 et $180.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Cependant ils observent que la séparation est beaucoup plus mauvaise dans le cas des fractions de plus hauts poids moléculaires, notamment les chaînes γ dont ils arrivent à estimer la masse moléculaire à $300.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. Ils ont également pu mettre en évidence l'existence de particules de très hauts poids moléculaire, qui résulteraient d'une agrégation des chaînes et dont la masse n'a pu être calculée en raison de la limite d'exclusion. En règle générale, les molécules de très hauts poids moléculaires sont éluées dans le volume mort par SEC à causes des limites d'exclusion de la colonne (Viebke & Williams, 2000).

Les différentes techniques analytiques utilisées dans la bibliographie, permettent d'estimer la masse moléculaire des différentes chaînes (α , β , γ) constitutives des solutions de gélatine, mais n'ont pas permis d'avoir une estimation des fractions de plus hauts poids moléculaires. Ceci montre l'intérêt d'utiliser une technique comme l'AFIFFF, qui présente l'avantage de l'absence de limite supérieure de taille de molécule.

Ceci nous permet donc de diviser le fractogramme en 5 parties (Figure 20) :

- **(1)** de 8 à 13 min : on peut l'attribuer aux chaînes α , avec une masse moléculaire comprise entre 50 et $100.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.
- **(2)** de 13 à 15 min : la masse moléculaire calculée est comprise entre 120 et $200.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, valeurs qui sont accords avec les valeurs théoriques des chaînes β .

- **(3)** de 15 à 19 min : cela correspondrait aux chaînes γ dont la masse moléculaire est comprise entre 200 et $400 \cdot 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$.
- **(4)** de 19 à 24 min : un signal qui traduit une proportion non négligeable de molécules de hauts poids moléculaires que l'on identifie sous la désignation P_1 . La masse moléculaire supérieure au million de g.mol^{-1} conduit à un signal MALS très intense.
- **(5)** de la 24^{ème} minute à la fin de l'élution: Cette population, appelée P_2 , présente une masse moléculaire estimée à $1 \cdot 10^7 \text{ g.mol}^{-1}$.

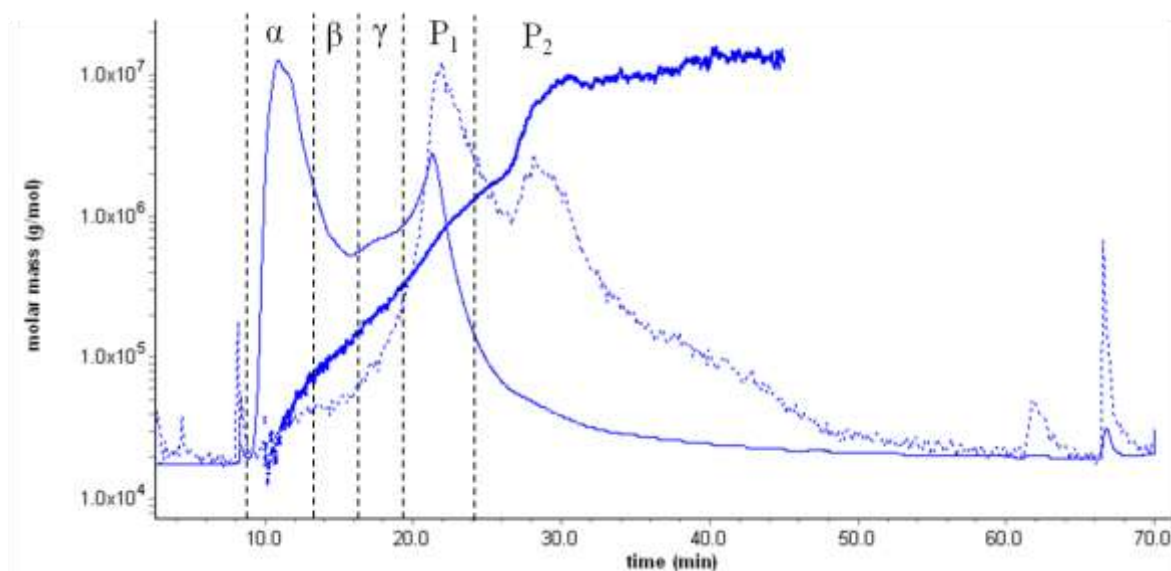


Figure 20: Identification des fractions protéiques de la gélatine

L'analyse par AFIFFF-MALS met bien en évidence la polydispersité que l'on peut observer dans une solution de gélatine. Outre la détermination des masses moléculaires des principales chaînes constitutive de la gélatine, elle permet d'estimer la masse moléculaire de particules de très hautes masses (P_1 ; P_2) résultant probablement de l'agrégation des chaînes entre-elles.

L'utilisation d'une technique comme l'AFIFFF-MALS a donc permis d'avoir une meilleure estimation de la distribution en masse d'une solution de gélatine. L'avantage de cette technique contrairement aux méthodes chromatographiques comme la SEC, est que les biopolymères ne risquent pas d'être dégradés par des phénomènes de cisaillement. D'autre part, selon leurs propriétés (polarité, charges, etc.), l'affinité de la colonne chromatographique peut ne pas être compatible avec les macromolécules à séparer. De ce fait

l'AFIFFF-MALS permet une vision plus intéressante de ce qui se passe en solution. Elle est un atout complémentaire aux méthodes traditionnelles.

V. Conclusion

Cette étape d'optimisation et de développement analytique a permis de confirmer la polydispersité et l'hétérogénéité des solutions de gélatine. Cette technique permet de compléter les méthodes déjà existantes, en apportant une vision plus globale de la répartition protéique dans les solutions de gélatine. Cette étude est d'autant plus intéressante qu'aucune donnée relative à ce sujet n'est réellement disponible. L'exploitation d'un tel outil analytique, notamment dans la compréhension de l'insolubilité de la gélatine en solution aqueuse, induite certainement par formation d'agrégats de hauts poids moléculaire, pourrait être pertinente.

*Chapitre III. Etude du vieillissement de la gélatine par
AFIFFF-MALS*

I. Introduction

Comme on a pu le voir dans le chapitre précédent, l'utilisation de l'AFIFFF-MALS comme outil analytique est très intéressante pour la détermination des masses moléculaires. Elle permet d'observer la forte hétérogénéité existant dans les solutions de gélatine, avec notamment la mise en évidence de particules (P_1 , P_2) de très hauts poids moléculaires, ces particules jouent un rôle certainement non négligeable dans la qualité, car il est souvent admis que les propriétés fonctionnelles des biopolymères dépendent de leurs masses moléculaires (Farahnaky *et al.*, 2003). Dans le cas de la gélatine, la compréhension de la perte de solubilité observée dans les capsules et films de gélatine est très importante et reste à l'ordre du jour pour les industriels du secteur pharmaceutique.

La bibliographie relate souvent ce phénomène comme dû à une réticulation de la gélatine. Les études ont souvent mis en évidence que les capsules et les films de gélatine prétraités et stockés dans des conditions de température et d'humidité élevées, présentaient une perte de solubilité, induisant la formation d'un film translucide autour de la gélule, et ralentissant la libération du principe actif.

D'autres études ont montré que même en l'absence d'agents réticulants, l'insolubilité de la gélatine pouvait apparaître, due à des réticulations naturelles, favorisées notamment par l'humidité et la température. Yannas et Tobolsky (1967) ont montré que l'exposition de films de gélatine à des températures élevées (entre 65 et 105°C) conduisaient à une insolubilité qui s'explique par la formation d'un réseau tridimensionnel résultant d'une réticulation interchaînes. Marks *et al.*, (1968) ont réussi à recréer le phénomène d'insolubilité sur grains de gélatine en mettant en place un test dit de « vieillissement accéléré ». La technique consiste à peser et placer une certaine quantité de gélatine en grains dans un flacon fermé hermétiquement et à le stocker dans une étuve ventilée à 75°C pendant quelques jours. Par cette méthode, ils observent une perte de solubilité de la gélatine en solution, qu'ils suggèrent être due à une polymérisation et/ou une agrégation des chaînes, probablement par réticulation et liaisons hydrogènes.

Les conditions de stockage et de traitement thermique, etc, accentuent donc le phénomène d'insolubilité qui induirait une augmentation de la masse moléculaire. Mais l'évolution de la masse moléculaire au cours d'un stockage n'a jamais fait l'objet d'une étude spécifique.

Nous nous proposons donc dans cette partie de faire un suivi par AFIFFF-MALS de l'évolution de la masse moléculaire au cours du vieillissement accéléré de la gélatine.

II. Suivi du « vieillissement accéléré » de la gélatine par AFIFFF-MALS

Dans notre étude, le vieillissement accéléré consiste à peser et placer une certaine quantité de gélatine en grains dans un flacon fermé hermétiquement et à le stocker dans une étuve ventilée à 75°C pendant 2, 4, 8, 15 et 30 jours. Cette méthode permet de recréer de l'insolubilité comme déjà observé par Marks *et al.*, (1968). Une quantification de l'insolubilité sera réalisée après centrifugation ainsi qu'une analyse de la partie soluble par AFIFFF-MALS.

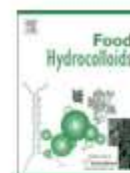
Si l'apparition de l'insolubilité induit la formation d'agrégats de hauts poids moléculaire, on pourra alors la suivre par AFIFFF-MALS. Cette étude a fait l'objet d'une publication :

Rbii, K., Violleau, F., Guedj, S., & Surel, O. (2009). Analysis of aged gelatin by AFIFFF-MALS: Identification of high molar mass components and their influence on solubility. *Food Hydrocolloids*, 23, 1024-1030;



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Analysis of aged gelatin by AFIFFF-MALS: Identification of high molar mass components and their influence on solubility

Khalid Rbii^{a,b}, Frédéric Violleau^{a,*}, Sylviane Guedj^b, Olivier Surel^a^a Université de Toulouse, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Laboratoire d'Agro-Physiologie, UPS/DGER 115, 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France^b Rousselot Isle sur la Sorgue SAS, F-84800 L'Isle sur la Sorgue, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2008

Accepted 5 August 2008

Keywords:

Asymmetrical flow field-flow fractionation

Multi-angle light scattering

Ageing process

Gelatin

Solubility

Aggregation

ABSTRACT

Gelatin is an important product for several industries and its solubility dramatically influences its functional properties. In order to be able to predict the gelatin behaviour, a new technique for its analysis has been developed with an Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to a multi-angle light scattering. The AFIFFF-MALS analysis showed the gelatin molar mass ranging from 5×10^4 to 2×10^7 g mol⁻¹. This technique also permitted to follow aggregation of gelatin samples after process in an oven at 75 °C. Between 0 and 4 days, some huge aggregates appeared. Their size and density increased without changing gelatin solubility. From 8 to 30 days, the molar mass and density of these aggregates increased leading to partial gelatin insolubilisation in water. This phenomenon is supposed to be due to cross-linking of the gelatin macromolecules.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Gelatin is a natural biopolymer obtained by denaturation and partial hydrolysis of fibrous collagen from bovine hide, bone and pigskin. Due to its unique functional properties (gel formation, thickening effect, film formation...), gelatin is a main ingredient in food, photographic, cosmetic and pharmaceutical industries (Schieber, & Gareis, 2007; Segtnan, Kvaal, Rukke, Schuller, & Isaksson, 2003).

In this latter field, gelatin is used in the manufacture of hard or soft capsules (Chiwele, Jones, & Podczek, 2000; Marchais, Cayzele, Legendre, Skiba, & Arnaud, 2003). These capsules are sometimes stored for a very long time before being used. Studies have shown that, depending on the quality of gelatin and conditions of storage (high humidity and/or high temperature), gelatin can become partially insoluble into water (Chafetz, Hong, Tsilifonis, Taylor, & Philip, 1984; Murty, Enders, & Fawzi, 1989). This causes the formation of translucent films around gelatin capsules that restrict drug release (Digenis, Gold, & Shah, 1994). As suggested by Marks, Tourtellotte, and Andux (1968), "insolubility can be due to polymerization and aggregation of gelatin molecules probably involving cross-linking and hydrogen bonding." This phenomenon could lead to the formation of high molar mass components. Consequently, the determination of the molar mass distribution could be very relevant to understand the insolubilisation phenomena.

Many techniques can be used to determine molar mass distribution of biopolymers (gel permeation, size exclusion, osmotic pressure, viscosity...) (Denis et al., 2008; Hwang et al., 1998). For gelatin analysis, molar mass distribution is usually determined by size exclusion chromatography coupled to a suitable detector (Meyer & Morgenstern, 2003). However, this method presents some restrictions like columns calibration, protein adsorption on chromatographic phase and total exclusion of very high molar mass compounds. Furthermore, it has also been reported that the disassociation of high molar mass components i.e. vesicles, micelles or weak aggregates can occur, due to the high shear forces generated in the column during the elution (Viebbe & Williams, 2000).

For gelatin analysis, as described by Fraunhofer, Winter, and Coester (2004), huge aggregates preservation and characterization can be obtained using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AFIFFF) coupled to Multi-Angle Light Scattering (MALS). This technique leads to the fractionation of proteins ranging from 1×10^4 to 1×10^7 g/mol whereas Size Exclusion Chromatography (SEC) gives size up to only 1×10^6 g/mol for the same sample. AFIFFF also fractionates ultra high molar mass components which are eluted in the exclusion peak with SEC. This kind of high molar mass aggregates are supposed to be responsible for insolubility problems with gelatin capsules. Thus, AFIFFF-MALS could be a relevant tool to investigate these phenomena.

The aim of this study was to demonstrate the ability of AFIFFF-MALS (i) to identify and characterize aggregates with high molar masses during gelatin ageing in an oven at 75 °C for 30 days (ii) to study influence of these aggregates on gelatin solubility in water.

* Corresponding author. Tel: +33 5 61 15 29 78; fax: +33 5 61 15 30 60.
E-mail address: frederic.violleau@purpan.fr (F. Violleau).

2. Theory

2.1. Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation

Described for the first time in 1960 by J.C. Giddings, Flow Field-Flow Fractionation (FFFF) is a new way of fractionation of ultra-large material from 1 kDa to a few micrometers (Myers, 1997; Wahlund, 2000). This technique is characterized by the particularity of a "soft" separation mechanism, which is ideally suitable to maintain the native structure of intact proteins (Reschiglian, Zattoni, Roda, & Cinque, 2005). Compared to other FFF methods (Sedimentation FFF – Hanselmann, Burchard, Ehrat, & Widmer, 1996 – and Thermal FFF – Lou, Myers, & Giddings, 1994), AFIFFF is more universal and efficient with a broader application range. It has been used for separation and characterization of many type of molecules of ultrahigh molar mass like biopolymers, colloids and particles (Giddings, Yang, & Myers, 1977; Litzén, Walter, Krischollek, & Wahlund, 1993; Wahlund, Gustavsson, MacRitchie, Nylander, & Wannerberger, 1996). The main component in an AFIFFF system is the separation channel (Fig. 1), in which the sample is carried with an aqueous or organic eluent in a laminar parabolic flow profile. In the case of the AFIFFF, an another flow perpendicular to the carrier flow called "cross-flow" is used to generate the force field, to separate the macromolecules in function of the diffusion coefficient during elution (Fig. 2).

As separation is governed by the diffusion coefficient D , a fundamental relationship between the retention time and the diffusion coefficient of a sample can be predicted by the Eq. 1:

$$t_R = \frac{t^0 \cdot V_C \cdot w^2}{6 \cdot V^0 \cdot D} \quad (1)$$

where t_R is the retention time of the component, t^0 is the void time (that is the retention time of unretained solute), w is the channel thickness, D is the diffusion coefficient, V_C is the volumetric cross-flow rate, V^0 is the volume of the separation channel

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (2)$$

If the Stokes–Einstein relationship Eq. 2 is combined with Eq. 1, the hydrodynamic diameter (d_H) can be predicted from Eq. 3.

$$d_H = \frac{2 \cdot k \cdot T \cdot V^0 \cdot t_R}{t^0 \cdot V_C \cdot w^2 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (3)$$

where k is the Boltzmann constant and, T the temperature and, η the eluent viscosity.

This technology is often coupled with multi-angle light scattering (MALS) detector which makes possible the determination of absolute molar mass and size of the fractionated molecules from AFIFFF.

2.2. Multi-Angle Light Scattering

Theory and principle of MALS is described in literature (Wyatt, 1993; Zimm, 1948). In solution, macromolecules scatter light in all directions and the scattered intensity depends on many parameters in particular the scattering angle, the molar mass and the radius of gyration (Andersson, Wittgren, & Wahlund, 2001). One of the relations which exists between these parameters is described by Zimm equation:

$$\frac{K \cdot c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 \cdot c \quad (4)$$

where K represents the optical constant, c is the concentration of macromolecules, M_w is their weight average molar mass, A_2 the second virial coefficient, and $P(\theta)$ is the scattering form factor. R_θ is the excess Rayleigh ratio which is function of the intensity measured at different angles according to

$$R_\theta = \frac{(I_{\theta(BP)} - I_{\theta(S)}) \cdot r_D^2}{I_0 V_0} \quad (5)$$

where I_θ is the scattering intensity of biopolymer solution (BP) and the solvent (S) at θ , I_0 is the intensity of the incident radiation, r_D is the distance between detector and scattering volume and V_0 is the scattering volume. $P(\theta)$ in Eq. 4 depends of the size and shape of the molecule and describes the angular dependence of the intensity of scattered light.

$$P(\theta) = \frac{1}{1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle r_g^2 \rangle^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad (6)$$

Coupled with fractionation technology (AFIFFF), the system is so diluted that c can be neglected. Eq. 4 can be written as $K \cdot c / R_\theta = 1 / M_w P(\theta)$.

If extrapolated at zero angle ($P(\theta) = 1$), the molar mass and the radius of gyration could be obtained from Zimm plot of $K \cdot c / R(\theta)$ vs. $\sin^2(\theta/2)$ (Fig. 3).

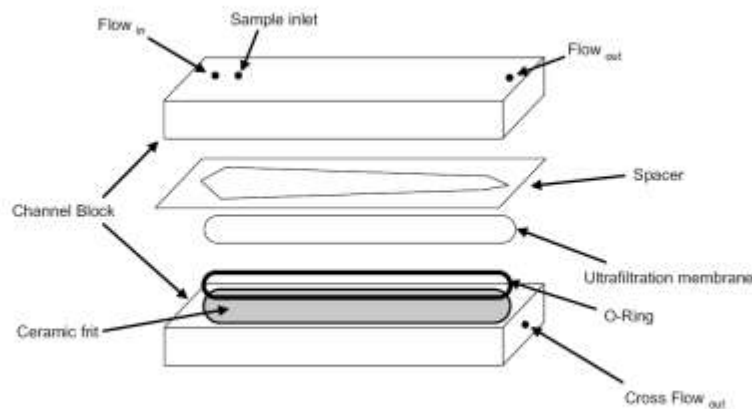


Fig. 1. Schematic representation of the AFIFFF channel.

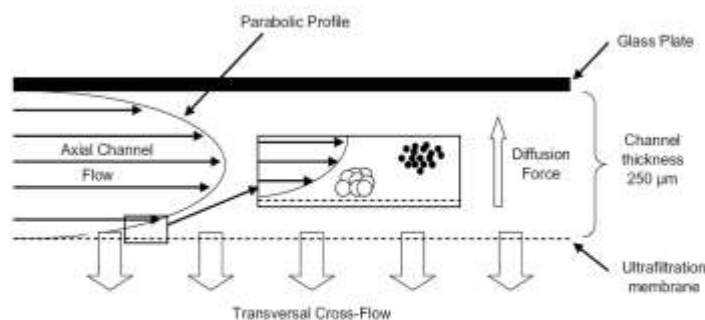


Fig. 2. Separation of samples in AFIFF in normal mode (● Small sample; and ○ large sample component).

3. Material and Methods

3.1. Materials

The gelatin sample used in this study was a type A from pig skin provided by Rousselot S.A.S (Isle sur la Sorgue, France), with a bloom strength of 253 and moisture content of 11% (w/w) determined after drying at 105 °C for 24 h.

3.2. Experimental

3.2.1. Eluent

As described by Fraunhofer et al. (2004), a 2 mM sodium phosphate with 14 mM sodium chloride buffer was used for eluted the gelatin. The pH was adjusted at 6.0 by addition of phosphoric acid (85.1 % v/v). The eluent was filtered before use (vacuum filtration system using Gelman filters of 0.1 µm).

3.2.2. Gelatin Accelerated Ageing

Six grams of gelatin powder were left in a 50 mL glass bottles. The bottles were closed hermetically and left in an oven at 75 °C for 2, 4, 8, 15 and 30 days. Each experiment was repeated twice.

3.2.3. Sample Preparation

Two grams of gelatin were weighed (m_s) accurately and dissolved in 100 mL of de-ionised water (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA). Gelatin was saturated with water for 30 min and then heated in a 55 °C water bath until it had completely melted. Samples were centrifuged at 13 000 rpm for 5 min. One millilitre of supernatant was added to 9 mL of eluent analyse by AFIFF-MALS. Therefore only soluble matter was analysed by this technique.

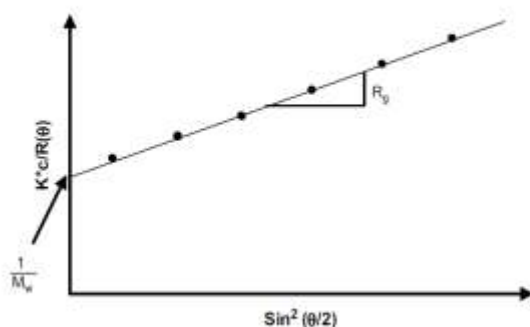


Fig. 3. Diagram of Zimm.

3.2.4. Determination of Insolubility

After elimination of the supernatant which was analysed by AFIFF-MALS, the residual sediment was freeze-dried for 12 h and weighed (m_s). For gelatin insolubility determination, the following formula was used:

$$\text{Insolubility (\%)} = 100(m_s/m_g)$$

3.2.5. Instruments

The AFIFF instrument was an Eclipse 2 System (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany). The AFIFF channel had a trapezoidal geometry where the length is 19.5 cm, with an initial breadth of 1.65 cm and final breadth of 0.27 cm. A Mylar spacer with a thickness of 250 µm was placed between the ultrafiltration membrane and the upper glass plate. The accumulation wall was an ultrafiltration membrane of regenerated cellulose with 5 kDa cut-off (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany). An Agilent 1100 Series Isocratic Pump (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with an in-line vacuum degasser and an Agilent 1100 Autosampler delivered the carrier flow and handled sample injection into the AFIFF channel. A 0.1 µm in-line filter (VVL, Millipore, Germany) was installed between the pump and the AFIFF channel. The AFIFF was connected to a 18 angles Multi-Angle Light Scattering (MALS) DAWN-DSP (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA), an OptiLRefractometer (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA), and a UV detector Agilent 1100 ($\lambda = 214$ nm). The MALS used a wavelength of 690 nm and the detectors were normalised with bovine serum albumin (BSA). For the calibration of scattering intensity, filtered toluene (HPLC grade) was used. UV detector was used as quantitative detector.

The specific refractive index increment, dn/dc , and UV extinction coefficient are necessary for the computation of the molar mass and of the gyration radius. These two parameters were determined by the injection of five different concentrations of the same gelatin into the refractometer and UV detector. Solutions of gelatin were injected through an injection valve (6 port, model 7725i, Rheodyne) and a sample loop of 2 mL in both detectors at a 1 mL min⁻¹ flow rate as described by Wittgren, and Wahlund (2000). Each sample injection induces a modification of the refractive index and UV absorbance. The slope of the differential curve of refractive index versus concentration brings dn/dc value, and UV absorbance versus concentration brings UV extinction coefficient value. The dn/dc value obtained was 0.164 mL g⁻¹ which was in agreement with formerly published (Tromp, ten Grotenhuis, & Olieman, 2002). The UV extinction coefficient value was fixed at 1.27 × 10⁴ mL g⁻¹ cm⁻¹.

3.2.6. Elution Method

For separation, the channel flow rate was fixed at 1 mL min⁻¹ and the cross-flow rate varied. The separation program started with 3 min

where the cross-flow rate was increased from 0.2 to 1.5 mL min⁻¹. Then the system switched in Focus mode, the cross-flow rate was stabilised 1 min before injection at 1.5 mL min⁻¹. Thirty microlitres of the sample solution were injected into the AFIFF channel at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. After injection, 1 min of focus was kept before the elution started. In elution mode, the cross-flow rate was primarily maintained for 6 min at 1.5 mL min⁻¹. After 6 min of elution at 1.5 mL min⁻¹, the cross-flow rate decreased linearly during 7 min, followed by an elution at 0.2 mL min⁻¹ for 40 min. This separation method permitted to have a good sample fractionation. The flow rate through the detectors, V_{out} , was constantly maintained at 1 mL min⁻¹.

3.2.7. Data Treatment

The signals from the detectors were analysed by Astra 5.3.2.10 (Wyatt technology, Santa Barbara, USA). The molar mass and radius

of gyration values were obtained from linear plots of $Kc/R_\theta = f(\sin^2(\theta/2))$ as described previously (Fig. 3).

4. Results and Discussion

Fig. 4A shows typical UV and light scattering (at 90°) detector profiles and molar masses for gelatin. The UV and MALS signals intensity changed a lot all along the elution. The delay in intensity between UV and MALS signals also indicated a large polydispersity of the gelatin. The fractogram can be divided into three sections. In the first one, from 0 to 8 min, it is possible to observe a large UV response with a low MALS response which is specific of small molecules. In the second one, from 8 to 16 min with a response of both detectors; molecules with intermediate size were eluted. In the last section from 16 min to the end of elution; molecules with large molar mass were

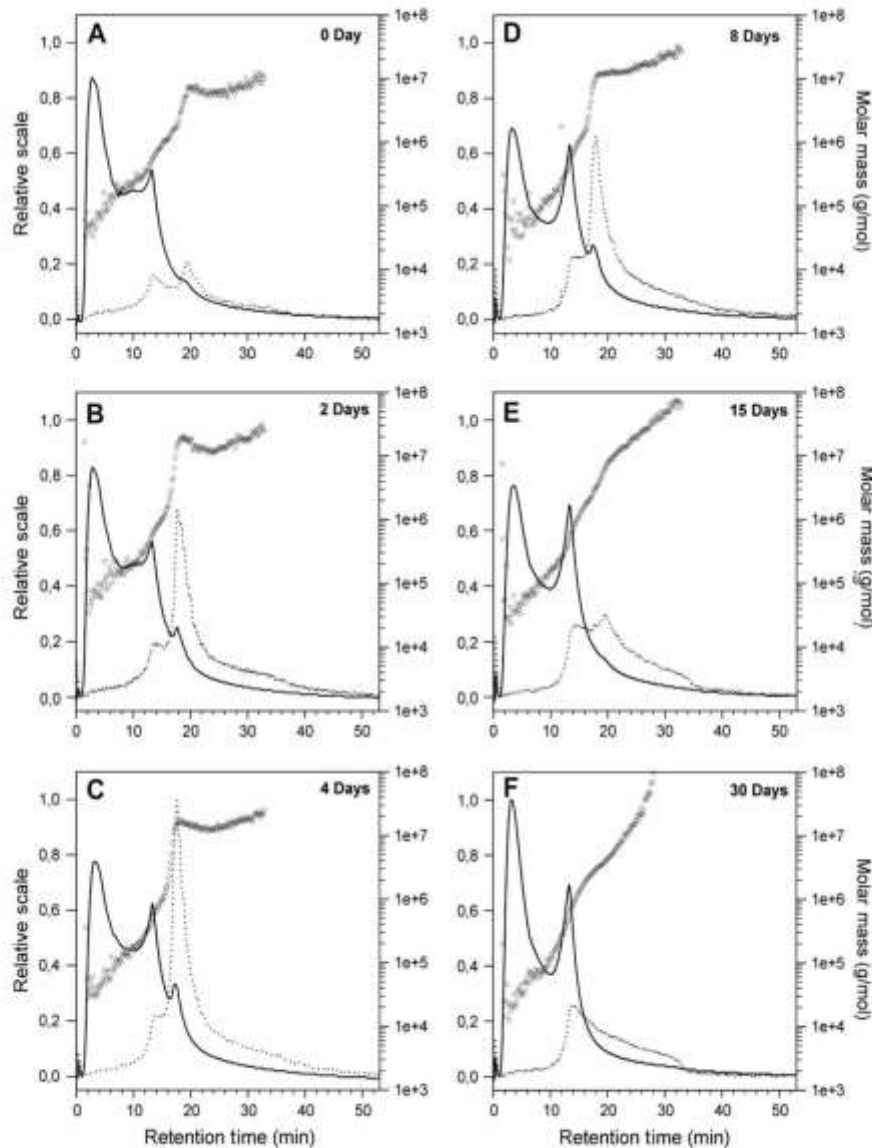


Fig. 4. Fractograms from AFIFF analysis of gelatin during ageing process (A) 0 days of ageing; (B) 2 days of ageing; (C) 4 days of ageing; (D) 8 days of ageing; (E) 15 days of ageing; (F) 30 days of ageing. UV signal (solid line – left axis), 90° light scattering signal (dotted line – left axis) and calculated molar mass (open circle – right axis).

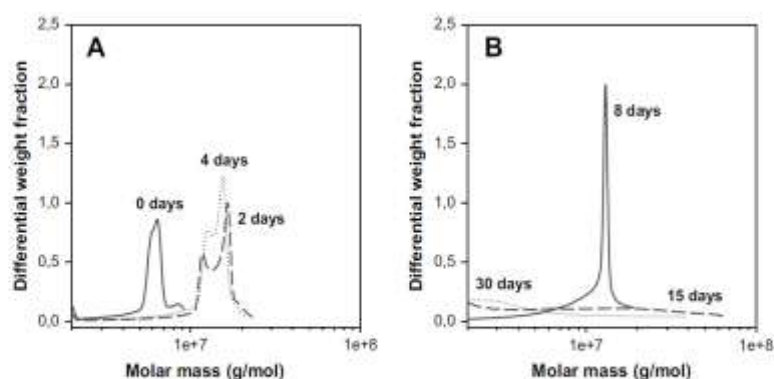


Fig. 5. Differential molar mass distribution between from 2×10^6 to 1×10^8 g mol⁻¹ of gelatin during ageing process. (A) 0 day (solid line); 2 days (medium dash line); 4 days (dotted line); (B) 8 days (solid line); 15 days (medium dash line); 30 days (dotted line).

eluted. Furthermore it was observed that the molar mass increased gradually with time which led to the conclusion that the elution was performed in normal mode (Fig. 2). This method is different from a steric elution that governs elution with species larger than $1 \mu\text{m}$. In this case, particle approach the ultrafiltration membrane at a distance lower than half of their hydrodynamic diameter. In this case elution order is then the opposite (large samples eluting first) compared to normal mode. The molar masses ranged from 3×10^4 to 1×10^7 g mol⁻¹ which was in agreement with the results obtained by Fraunhofer et al. (2004). In this study, molar mass of gelatin ranging from 1×10^4 to 1×10^7 g mol⁻¹ were found. This data confirmed the molar mass heterogeneity showed in our sample.

The evolution of the elution profiles of gelatin during the first part of the ageing process (from 0 to 4 days) is presented in Fig. 4A–C. If the fractograms were divided into three parts, as previously presented, it was observable from Fig. 4A–C that there was a slight decrease of the UV signal intensity at 3 min in the first section, which is the result of a decrease of quantity of low molar mass molecules. At the same time, there was a slight increase of the signal at 13 min in the second section, corresponding to the population of intermediate-sized (Fig. 4B,C).

In the last section, a new UV peak appeared around 18 min. This new UV peak became more and more intense during the ageing process. This indicated an increase of the quantity of new high volume molecules during the ageing process. At the same time, an increase of MALS signal was observed. Molar mass signal indicates no molar mass increase was observed for molecules eluted before 16 min whereas an important molar mass increase occurred for molecules eluted after 16 min. A shift to shorter retention times was also observed for the new UV peak obtained after 16 min of elution. According to Eq. 3, the decrease of the retention time was linked to a decrease of the hydrodynamic radius, thus the new aggregates became more compact.

The results obtained during the first part of ageing led us to think that an aggregation process of gelatin started at 2–4 days; this processed could be due to cross-linking of small molecules to create larger ones, resulting in larger aggregates eluted later.

The evolution of the elution profiles of gelatin during the second part of the ageing process (from 8 to 30 days) is presented in Fig. 4D–F. It may be noted that the UV and MALS profiles obtained in the second part of ageing went in the opposite direction to those previously observed, with an increase UV signal at 3 min and decrease of UV and MALS signals at 18 min.

The 8 days sample was comparable to the 2 and 4 days samples with the new UV peak at 18 min (Fig. 4D). At 15 and 30 days, this new peak disappeared (Fig. 4E,F). This was also confirmed by the MALS signal intensity that decreased. The fractogram profiles of the 15–30 days samples were not fully comparable to the initial sample.

Despite the disappearance of the 20 min MALS peak, a residual MALS signal from 20 to 30 min indicated the presence of huge aggregates. This is confirmed by molar mass curves where particles with molar masses higher than 10^7 were identified.

All these observations are confirmed by differential molar mass distribution represented in Fig. 5. Molar mass distribution is represented from 2×10^6 g mol⁻¹ to 1×10^8 g mol⁻¹. Within this range, differences between gelatin with different ageing times are observed. Appearance of high molar mass components during the first part of ageing (Fig. 5A) is confirmed, as well as its disappearance during the second part of ageing (Fig. 5B).

In Fig. 6, evolution of radius of gyration is presented. From 0 to 12 min, radius of gyration calculated is very noisy. In fact, radius of gyration less than 1/20 of the incident laser wavelength can't be determinate. At 18 min, in Fig. 6A–C, an increase of the radius of gyration is observed. Maximum value of radius of gyration is about 200 nm. In Fig. 6D–F with disappearance of peak at 18 min, the step observed previously disappears. In the same time, an increase of the radius of gyration is observed at the end of the fractogram. Radius of gyration can increase to 500 nm.

Simultaneously to the molar mass, the radius of gyration of aggregates increased indicating an increase of their size.

High molar mass component appearance and disappearance showed by AFIFF-MALS analysis led to change of average M_w value (Fig. 7). From 0 to 4 days ageing samples, M_w increased (0 days – 9.5×10^5 g mol⁻¹; 2 days – 25.5×10^5 g mol⁻¹; 4 days – 30.2×10^5 g mol⁻¹). At the same time, no insolubility was observed for same samples. From 8 to 30 days average M_w decreased (8 days – 27.8×10^5 g mol⁻¹; 15 days – 26.1×10^5 g mol⁻¹; 30 days – 15.9×10^5 g mol⁻¹) and insolubility increased until 45%.

This loss of solubility for gelatin aged over 8 days is concomitant with the disappearance of molecules high molecular weights observed by AFIFF-MALS. This leads us to believe that until a size that is considered as "critical" the molecules of very high molar mass became insoluble and not observable by this technique.

Insolubilisation of gelatin is a well known phenomenon since it has been pointed out many years ago (Marks et al., 1968). Our results could suggest that the ageing process of gelatin led to a phenomenon of aggregation, in which small molecules gradually aggregate and produce larger structure which could alter gelatin solubility. During the first part of the ageing process there is an aggregation phenomenon leading to soluble large and compact molecules formation (from 1×10^5 to $2-3 \times 10^7$ g mol⁻¹). When the size and/or the density of these aggregate do not permit this solubility, they disappeared from the soluble fraction analysed by AFIFF-MALS. This was observed in the second part of ageing where only the soluble fraction was analysed.

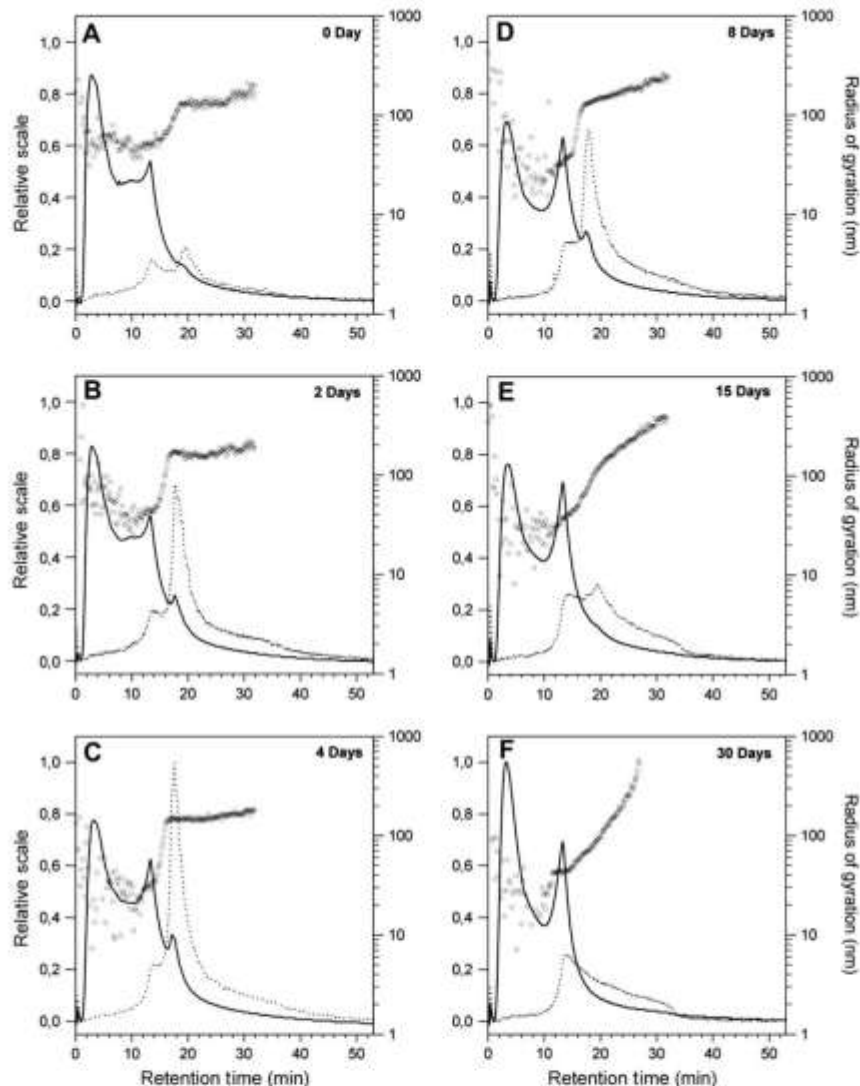


Fig. 6. Fractograms from AFIFFF analysis of gelatin during ageing process (A) 0 days of ageing; (B) 2 days of ageing; (C) 4 days of ageing; (D) 8 days of ageing; (E) 15 days of ageing; (F) 30 days of ageing, UV signal (solid line – left axis), 90° light scattering signal (dotted line – left axis) and calculated radius of gyration (open circle – right axis).

During the ageing process, the samples are subjected to high temperatures. We can hypothesize that this phenomenon can lead to change in the conformation of protein, inducing protein chain closeness and enabling cross-linking and/or hydrogen bonding between gelatin macromolecules. All these phenomena could explain the increase of molar masses and density of macromolecule which finally led to their insolubility.

Marks et al. (1968), who study gelatin solubility behaviour during accelerated ageing process, considered that insolubility appears to be a aggregation of gelatin molecules, probably involving hydrogen bond and cross-linking. It should be noted here that such reactions occur relatively slowly at moderate temperatures in the absence of a catalyst. Concerning the reaction at the origin of these phenomena, many hypotheses have emerged, notably by formation of interchain amide links and the preponderant role of α -amino groups of

lysine during the reaction (Yannas, & Tobolsky, 1967). Furthermore, many researchers (Brown, Madit, Cole, Wilding, & Cadé, 1996; Carvalho, & Grosso, 2006; Fuget, Platerink, & Janssen, 2007; Ofner, Zhang, Jobeck, & Bowman, 2001) have sought evidence in the important of the role of the lysine in gelatin reticulation by chemical reaction with glutaraldehyde and formaldehyde. These authors observed that a chemical modification especially on gelatin film and capsules causes a decrease of solubility.

5. Conclusion

In this study we showed the efficiency of AFIFFF-MALS technology to determine molar mass distribution of gelatin samples. High polydispersity was showed. This analytical technology also permitted to follow the formation and insolubilisation of huge

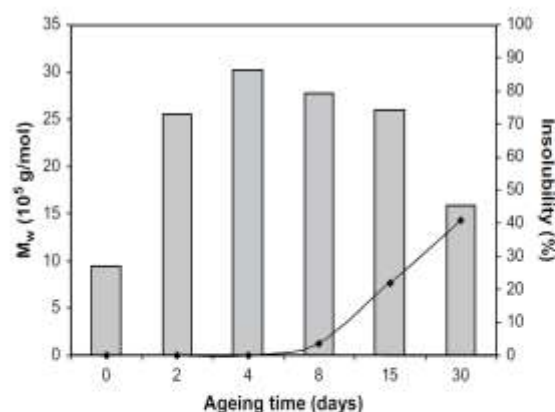


Fig. 7. Evolution of Molar Mass Weight Average of gelatin sample (bar – left axis) and gelatin insolubility (curve – right axis) during ageing process.

gelatin aggregates during ageing at 75 °C. These observations have been achieved thanks to moderate conditions during AFIFFF experiments leading to nondestructive fractionation. We hypothesized that characterization of these samples couldn't be obtained by SEC due to abrasive shear stress and component trapping on column package material. We also demonstrated that insolubilisation was due to size and density increase. Influence of water content and temperature on aggregation kinetic is going to be studied. Use of denaturing or chaotropic agent (SDS 0.5%, Urea 8 M, guanidine 6 M) added in solvent and additional research to isolate and characterize these gelatin aggregates is necessary to identify chemical and/or physical phenomena involved in gelatin aggregation during ageing process. Comprehension of these phenomena should permit to control gelatin quality during production process.

Acknowledgements

We thank Alain Denis, Claude Ridoux and Nicolas Grosjean for their participation in this project.

References

- Andersson, M., Wittgren, B., & Wahlund, K. G. (2001). Ultrahigh molar mass component detected in ethylhydroxyethyl cellulose by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to multiangle light scattering. *Analytical Chemistry*, 73(20), 4852–4861.
- Brown, J., Madit, N., Cole, E. T., Wilding, I. R., & Cadé, D. (1996). The effect of cross-linking on the in vivo disintegration of hard gelatin capsules. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1026–1030.
- Carvalho, R. A., & Grosso, C. R. F. (2006). Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 45–53.
- Chafetz, L., Hong, W., Tsilifonis, D. C., Taylor, A. K., & Philip, J. J. (1984). Decrease in the rate of capsule dissolution due to formaldehyde from polysorbate 80 auto-oxidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73, 1186–1187.
- Chiwele, I., Jones, B. E., & Podczek, F. (2000). The shell dissolution of various empty hard capsules. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 48(7), 951–956.
- Denis, A., Brambati, N., Dessauvages, B., Guedj, S., Ridoux, C., Meffre, N., et al. (2008). Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids*, 22, 989–994.

- Digenis, G. A., Gold, T. B., & Shah, V. P. (1994). Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *Journal of Pharmaceutical Science*, 83(7), 915–921.
- Fraunhofer, W., Winter, G., & Coester, C. (2004). Asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering for analysis of gelatin nanoparticle drug carrier systems. *Analytical Chemistry*, 76(7), 1909–1920.
- Fuget, E., Platerink, C. V., & Janssen, H. G. (2007). Analytical characterisation of glutaraldehyde cross-linking products in gelatine-gum arabic complex coacervates. *Analytica Chimica Acta*, 604(1), 45–53.
- Giddings, J. C., Yang, F. J., & Myers, M. N. (1977). Flow field-flow fractionation as a methodology for protein separation and characterization. *Analytical Biochemistry*, 81(2), 395–407.
- Hanseimann, R., Barchard, W., Ehrat, M., & Widmer, H. M. (1996). Structural properties of fractionated starch polymers and their dependence on the dissolution process. *Macromolecules*, 29(9), 3277–3282.
- Hwang, J. S., Yang, Z. P., Dai, S. B., Tian, S. L., Kuo, M. T., & Lin, C. L. (1998). Diffusion analysis of gelatin solutions by photocorrelation spectroscopy. *Chinese Journal of Physics*, 36(5), 733–745.
- Litzén, A., Walter, J. K., Krischollek, H., & Wahlund, K. G. (1993). Separation and quantitation of monoclonal antibody aggregates by asymmetrical flow field-flow fractionation and comparison to gel permeation chromatography. *Analytical Biochemistry*, 212(2), 469–480.
- Lou, J., Myers, M. N., & Giddings, J. C. (1994). Separation of polysaccharides by thermal field-flow fractionation. *Journal of liquid chromatography*, 17(14), 3239–3260.
- Marchais, H., Cayzele, G., Legendre, J. Y., Skiba, M., & Arnaud, P. (2003). Cross-linking of hard gelatin carbamazepine capsules: effect of dissolution conditions in vitro drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 129–132.
- Marks, E. M., Tourtellotte, D., & Andux, A. (1968). The phenomenon of gelatin insolubility. *Food Technology*, 22, 1433–1436.
- Meyer, M., & Morgenstern, B. (2003). Characterization of gelatine and soluble collagen by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). *Biomacromolecules*, 4, 1727–1732.
- Murty, K. S., Enders, N. A., & Fawzi, M. B. (1989). Dissolution stability of hard-shell capsule products, part I: the effect of exaggerated storage conditions. *Pharmaceutical Technology*, 13, 72–85.
- Myers, M. N. (1997). Overview of field-flow fractionation. *Journal of Microcolumn Separation*, 9(3), 151–162.
- Ofner, C. M., Zhang, Y., Jobeck, V. C., & Bowman, B. J. (2001). Crosslinking studies in gelatin capsules treated with formaldehyde and in capsules exposed to elevated temperature and humidity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 79–88.
- Reschiglian, P., Zaitoni, A., Roda, B., & Cinque, L. (2005). On-line hollow-fiber flow field-flow fractionation-electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry of intact proteins. *Analytical Chemistry*, 77(1), 47–56.
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatin handbook: Theory and industrial practice*. Weinheim: Wiley-VCH: Verlag GmbH & KGaA.
- Seytman, V. H., Kvaal, K., Rukke, E. O., Schuller, R. B., & Isaksson, T. (2003). Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatine using near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17, 585–592.
- Tromp, R. H., ten Grotenhuis, E., & Olieman, C. (2002). Self-aggregation of gelatine above the gelling temperature analysed by SEC-MALS. *Food Hydrocolloids*, 16, 235–239.
- Viebbe, C., & Williams, P. A. (2000). Determination of molecular mass distribution of λ -carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field flow fractionation. *Food Hydrocolloids*, 14, 265–270.
- Wahlund, K. G. (2000). Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. In M. E. Schimpf, K. D. Caldwell, & J. C. Giddings (Eds.), *Field-flow fractionation handbook* (pp. 279–294). New York: John Wiley & Sons.
- Wahlund, K. G., Gustavsson, M., MacRitchie, F., Nylander, T., & Wannerberger, L. (1996). Size characterisation of wheat proteins, particularly glutenin, by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Cereal Science*, 23, 113–119.
- Wittgren, B., & Wahlund, K. G. (2000). Size characterization of modified celluloses in various solvents using flow FFF-MALS and MB-MALS. *Carbohydrate Polymers*, 43, 63–73.
- Wyatt, P. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, 272(1), 1–40.
- Yannas, I. V., & Tobolsky, A. V. (1967). Cross-linking of gelatine by dehydration. *Nature*, 215, 509–510.
- Zimm, B. J. (1948). The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physics*, 16(12), 1093–1099.

III. Bilan de l'étude du vieillissement accéléré de la gélatine par AFIFFF-MALS

Le travail met bien en évidence l'apparition de molécules de hauts poids moléculaires au cours du vieillissement accéléré de la gélatine. Le stockage à haute température, favoriserait les réticulations et/ou de liaisons hydrogènes interchaînes entraînant une augmentation de la masse moléculaire, qui se traduit comme on peut le voir sur la *Figure 21*, par une quantité plus importante de particules P₂.

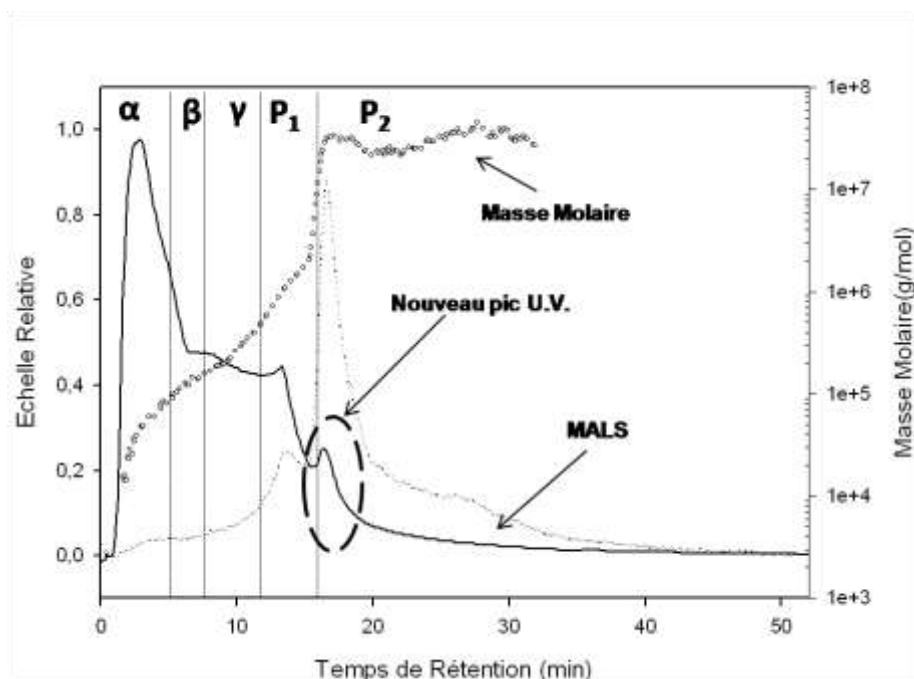


Figure 21: Echantillon de gélatine vieilli à 2 jours

Cette population P₂, pratiquement négligeable à T₀, prend une importance significative au cours du vieillissement accéléré. Durant la première partie du vieillissement (0 au 4^{ème} jour), l'évolution de la masse moléculaire est principalement due à l'augmentation en quantité des particules P₂. A partir du 8^{ème} jour du vieillissement, l'insolubilité de la gélatine apparaît. Les analyses par AFIFFF-MALS montrent une diminution de la masse moléculaire. En effet lorsque la taille des particules et/ou la densité ne permettent plus la solubilisation, ils disparaissent alors de la fraction soluble analysable par AFIFFF-MALS ce qui explique la diminution de la masse moléculaire, au cours de la deuxième partie du vieillissement (8^{ème} au 30^{ème} jour).

L'AFIFFF-MALS confirme l'hypothèse de départ, qui est que l'insolubilité est fortement liée à la masse moléculaire. Cette insolubilité peut être associée à la présence des particules P₂, qui n'auraient pu être mises en évidence par d'autres techniques analytiques.

Comme proposé par Harrington et Rao (1970) pour expliquer la transition conformationnelle pelote-hélice impliquée dans les solutions de gélatine, en fonction de la concentration et de la vitesse de refroidissement, nous nous proposons à travers la *Figure 22* de donner une explication du changement observé lors du vieillissement accéléré.

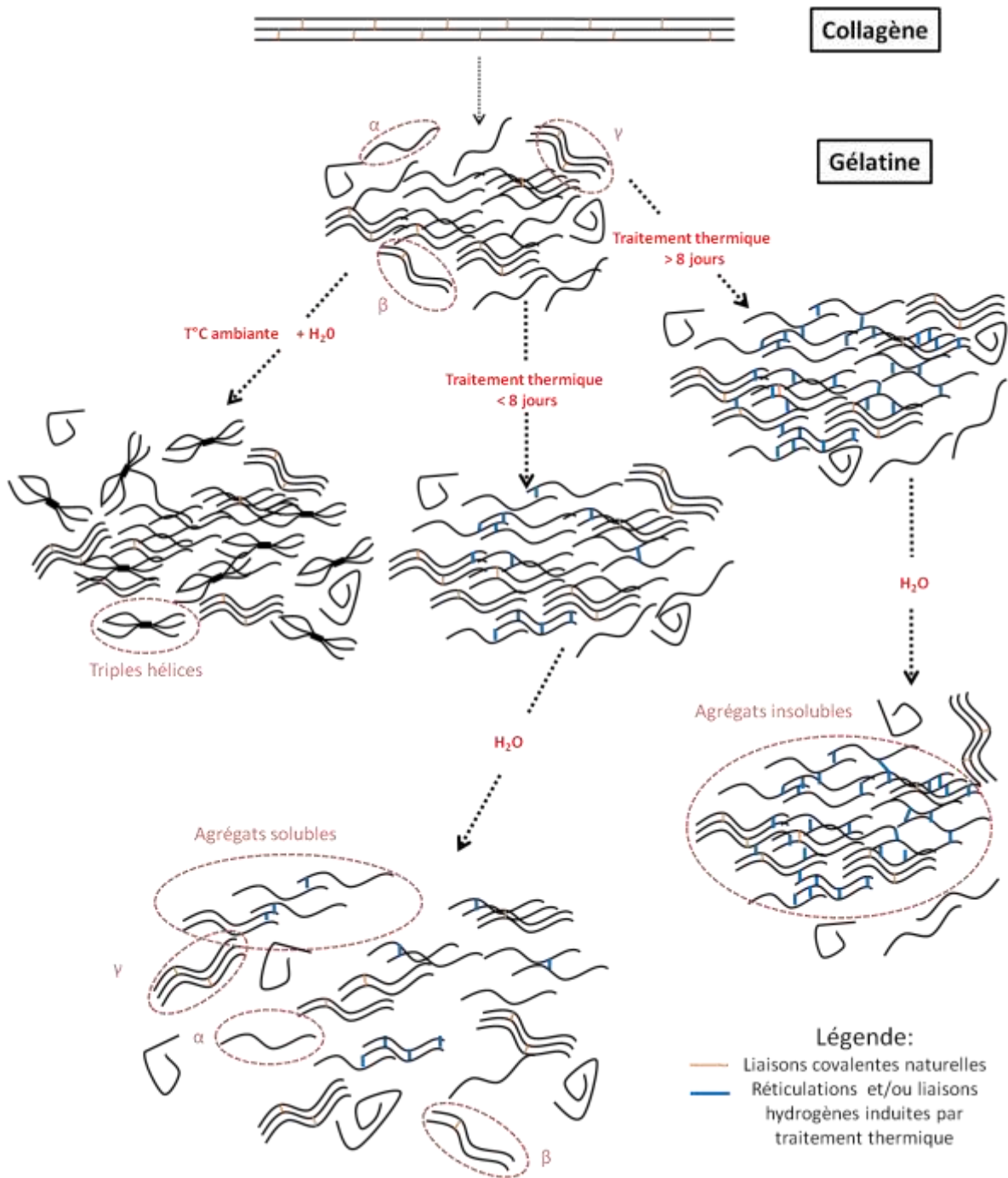


Figure 22: Effet du traitement thermique sur la gélatine

Lorsque la gélatine subit un traitement thermique, une forte augmentation de la masse moléculaire est observée par AFIFFF-MALS, induisant l'apparition d'insolubles. Ceci nous amène à penser que:

- durant la première partie du vieillissement (< 8 jours), le traitement thermique induit une réticulation par liaisons covalentes et/ou hydrogènes favorisées par la proximité des chaînes entre-elles. Les petites fractions s'agrègent pour former des structures plus grosses qui restent encore solubles dans l'eau.
- si le vieillissement perdure au-delà de 8 jours, une insolubilité est observée. Une réticulation plus importante se produit qui engendre certainement une forte compacité entraînant alors la formation d'agrégats insoluble dans l'eau.

Mais est-ce que le phénomène d'agrégation n'est pas dû simplement à une réorganisation en hélice de la gélatine en solution ?

En effet, lorsque la température est inférieure à 35°C , une transition conformationnelle pelote statistique \rightarrow hélice a lieu, transition qui se fait par repliement des chaînes sur elles-mêmes, stabilisées par des liaisons hydrogènes intramoléculaires à des concentrations faibles ($C \sim 0,01\% \text{ P/P}$) et, principalement, par liaisons intermoléculaires lorsque la concentration est plus importante.

Ceci suggère l'intérêt du suivi de la renaturation de la gélatine en solution par AFIFFF-MALS et c'est ce que nous proposons de développer dans le **chapitre IV**.

Chapitre IV. Renaturation de la gélatine

I. Introduction

Le vieillissement accéléré a montré que l'insolubilité observée dans les solutions de gélatine est principalement due à l'apparition d'agrégats de hauts poids moléculaires (cf. Chapitre III). Il est établi que la gélatine se réorganise en solution car les chaînes tendent à reformer la structure du collagène quand la température est inférieure à 35°C (Ward & Courts, 1977 ; Djabourov *et al.*, 1988). L'association des chaînes, au niveau des séquences hélicoïdales, entraîne la formation d'un réseau tridimensionnel. Boedtker et Doty (1954) en réalisant des trempes thermiques à basse température ($T=18^{\circ}\text{C}$) sur des solutions de gélatine très diluées, ont montré que la formation du réseau de gélatine est le résultat d'un processus d'agrégation de chaînes.

Harrington et Rao (1970) ont montré que le processus de renaturation est différent selon la concentration en gélatine. Pour de faibles concentrations ($C \sim 0.01\%$ P/P), la transition pelote-hélice se fait par repliement de la chaîne sur elle-même, stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. À des concentrations plus importantes, cette renaturation est liée principalement à des liaisons intermoléculaires, conduisant à la gélification de la gélatine à des concentrations supérieures à 0.5-1.0% en poids. Cette gélification est causée par la formation d'un réseau de molécules connectées entre-elles dans la solution de gélatine (Guo *et al.*, 2003).

La cinétique de renaturation de la gélatine en solution aqueuse a été étudiée par plusieurs auteurs. Différentes techniques ont pour cela été utilisées. Une des premières interprétations de la cinétique de renaturation a été faite par Godard *et al.*, en 1978 par D.S.C (Differential Scanning Calorimetry). Ils observent une augmentation rapide de la quantité d'hélices dès les premières heures de la mise en solution à température ambiante. Ces résultats ont été corroborés par polarimétrie en mesurant le pouvoir rotatoire dans les solutions de gélatine (Djabourov *et al.*, 1985). Des études par RMN ^1H , ont également montré que les molécules d'eau jouent un rôle important dans la structure des triples hélices et qu'elles contribuent à la cinétique de croissance de la structure en réseau. Pezron *et al.*, (1990) confirment cela par la technique de diffusion des neutrons aux petits angles, où ils mettent en évidence le rôle du solvant et notamment de l'eau dans la structuration des triples hélices. Herning *et al.*, (1991) ont suivi ce phénomène de renaturation par diffusion quasi-élastique de la lumière. Ils concluent, que la taille des agrégats dépend fortement de la masse moléculaire des chaînes impliquées dans l'agrégation.

Dans la bibliographie, l'influence de la température a déjà été abordée, particulièrement dans la compréhension du comportement de la gélatine en solution. Djabourov et Papon (1983), suggèrent que la renaturation est fortement dépendante de la température et notamment, qu'à des températures supérieures à 20°C, la renaturation des hélices est beaucoup plus lente et permet la croissance partielle de structures qui ont une stabilité proche de celle du collagène. Plus récemment, Olivares *et al.*, (2006) ont observé par des mesures de viscosité, que le procédé de renaturation produit des agrégats polydisperses. A de faibles températures, ces derniers sont plus désordonnés, tandis qu'à températures plus élevées, les agrégats sont plus compacts.

La renaturation de la gélatine, ainsi que le vieillissement accéléré, sont deux phénomènes qui induisent une évolution de la masse moléculaire apparente de la gélatine. Afin de comprendre l'agrégation obtenue au cours du vieillissement accéléré, et de savoir si le phénomène observé est simplement lié à une renaturation de la gélatine en solution, on se propose de faire dans un premier temps un suivi de la renaturation de la gélatine en solution par AFIFFF-MALS. Cette cinétique de renaturation sera effectuée sur une gélatine non vieillie afin de comparer son profil à une gélatine ayant subi un vieillissement accéléré.

Dans un deuxième temps un suivi de renaturation sera effectué sur une gélatine vieillie, afin d'observer si un traitement thermique préalable permet ou non aux différentes fractions de se réorganiser en solution (*Figure 23*).

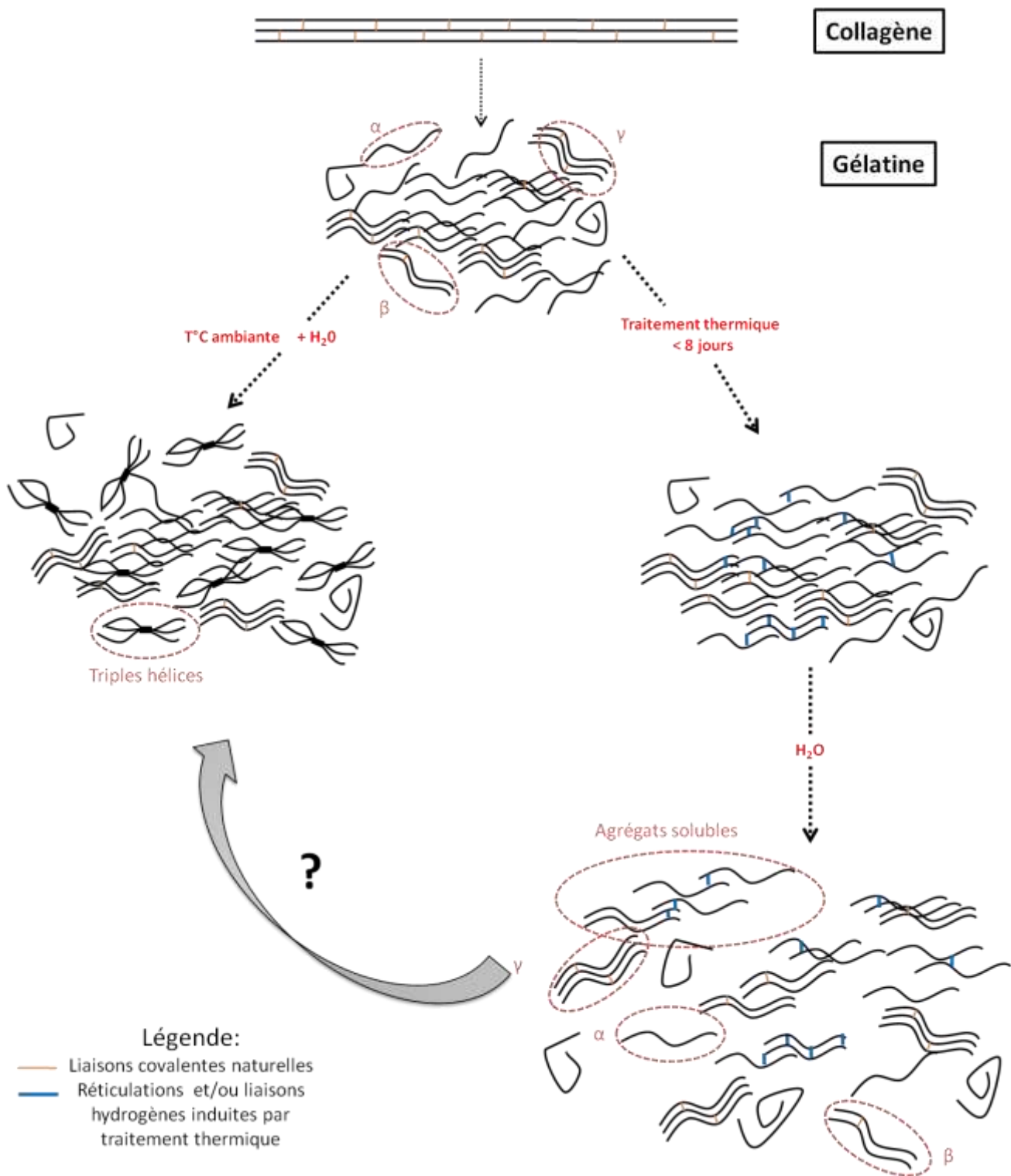


Figure 23: Effet du traitement thermique sur la réorganisation de la gélatine en triples hélices

II. Etude de la renaturation de la gélatine par AFIFFF-MALS

La méthode consiste à analyser une solution de gélatine (non vieillie et vieillie) par AFIFFF-MALS toutes les deux heures et de regarder l'évolution des différentes fractions au cours du temps.

Cette étude a mis en évidence une évolution des profils UV, ainsi qu'une évolution de la masse moléculaire au cours du temps, traduisant une réorganisation de la gélatine en solution.

Elle a fait l'objet d'une 2ème publication (soumise):

Khalid Rbii, Olivier Surel, Noëlle Brambati, Anne-Marie Buchert, Frédéric Violleau: "Study of gelatin renaturation in aqueous solution by AFIFFF-MALS: influence of a thermal pre-treatment applied on dry gelatin" *Food Hydrocolloids*.

Study of gelatin renaturation in aqueous solution by AFIFFF-MALS: influence of a thermal pre-treatment applied on dry gelatin

Khalid Rbii^{1,2}, Olivier Surel¹, Noëlle Brambati², Anne-Marie Buchert², Frédéric Violleau^{1*}

¹ Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie ; UPSP/DGER 115; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

² Rousselot Isle sur la Sorgue SAS, F-84800 L'Isle sur la Sorgue, FRANCE

* Corresponding author. Tel: +33 5 61 15 29 78.

E-mail address: frederic.violleau@purpan.fr (F. Violleau)

Abstract

The Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation coupled to Multi-Angle Light Scattering has been applied to study and understand the renaturation phenomenon of gelatin in dilute aqueous solutions. The renaturation behavior has been studied on a native gelatin and compared to the same gelatin in powder, pre-heated at 75 ° C. An increase of molar mass, due to gelatin chains association at room temperature was observed for native gelatin. AFIFFF-MALS analysis permitted to follow α , β , γ chains association and other fraction with higher molar mass. This process was absent in pre-heated gelatin. The pre-heating process of dry gelatin could lead to interactions between gelatin chains which limited the renaturation process in aqueous solution. For the pre-heated gelatine samples, the average initial molar mass was higher and hardly changed during incubation of a dilute solution.

Keywords: Asymmetrical flow field-flow fractionation; Multi-angle light scattering; Gelatin; Incubation process; Chain association

Introduction

Gelatin is a natural polymer, obtained from thermal denaturation, physical and chemical degradation of fibrous collagen from bovine hide, bone or pigskin (Ledward, 1986; Ward & Courts, 1977). Thus, in aqueous solutions, gelatin is a mixture of different proteic chains resulting from collagen denaturation. Three main chain sizes (α , β , γ) are generally identified in gelatin solutions; α chain is a monomer whereas β and γ correspond roughly to dimers and trimers of the α chain. The molar mass of purified α chains is close to $90 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, whereas that of the β and γ components can reach 180 and $300 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ respectively (Piez, 1967; Boedtker & Doty, 1956).

In aqueous solution at room temperature the gelatin chains undergo a conformational coil to helix transition which is responsible for the gel network structure creation, if the concentration is high enough (Veis, 1964 ; Pezron, Djabourov & Leblond, 1991). The self-association of gelatin chains by triple helix formation results in an increase of the apparent molar mass (Lundin, Norton, Foster, Williams, Hermansson, & Bergström, 2000). This has been underlined by Olivares, Peirotti and Deiber (2006) who have shown an increase of gelatin viscosity during renaturation process, due to association phenomenon. They find that this process produces polydisperse associations with the incubation time of a dilute solution of gelatin. The clusters are formed through chain association involving weak bonds between the triple helixes.

Many techniques (light scattering, gel permeation, size exclusion, osmotic pressure, viscosity) have been used to determine the different fractions constituting gelatin in solution (M. Meyer & B. Morgenstern (2003). The size exclusion chromatography (SEC) coupled to MALS highlights the presence of α , β and γ different chains forming the gelatine but also the existence of particles of hMW which could not be determined due to the exclusion limit. Generally, the ultra-high molecular weight (ultra-hMW) components are eluted close to the exclusion limit of the SEC columns (Viebké & Williams, 2000). Due to the lack of such drawbacks, AF4FFF is a separation technique that can be considered as an alternative (no total exclusion peak, low shear stress) to SEC for the characterisation of polymers, biopolymers, macromolecules, colloids (Giddings, Yang & Myers, 1977; Wahlund,

Gustavsson, MacRitchie, Nylander & Wannerberger, 1996) and gelatin (Fraunhofer, Winter & Coester, 2004).

We have shown in recent work (Rbii, Violleau, Guedj & Surel, 2009) the efficiency of AFIFFF-Mals to highlight the occurrence of very hMW aggregates leading to gelatin insolubility after a thermal pre-treatment at 75°C applied on gelatin powder. Aims of our works were to study the effects of the same thermal pre-treatment applied on gelatin powder on the renaturation phenomenon. We studied the renaturation behavior of a standard gelatin and compared it to the renaturation behavior of the same gelatin pre-heated at 75 ° C in powder.

Material and methods

Native dry Gelatin (NG) sample

Gelatin used was kindly provided by the Rousselot S.A.S (Isle sur la Sorgue, France). It was an acid pig skin gelatin with the following physical properties: Bloom: 263 g; Viscosity at 6.67%: 4.62 mPa.s; Isoelectric point: 9.3 ; Moisture (w/w); 11%. Molar mass distribution characteristics were: $M_n = 98.5 \cdot 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ and $M_w = 100.7 \cdot 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

Thermal Pre-treated Gelatin powder (TPG) preparation

Six grams of native dry gelatin powder (NG) were left in 50 mL glass bottles. The bottles were closed hermetically and left in an oven at 75°C for 2 days. Each experiment was repeated twice.

These thermal treatment conditions lead to modification of gelatin behaviour in water as described previously (Marks et al., 1968; Rbii et al., 2009).

Sample preparation and Incubation

NG and TPG samples were prepared as follows. First, the gelatin powder was subjected to a hydration step with de-ionised water (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA) (resistivity of 18.2 MΩcm) for 1 hour, in order to let the gelatin powder swell. Then the mixture was heated in a water bath at 55°C until it has completely melted. One millilitre of the solution was added to 9 mL of eluent used during AFIFFF-MALS analysis (2 mM sodium phosphate with 14 mM sodium chloride buffer pH 6.0). NG

and TPG samples with a 2 mg/mL concentration were incubated at room temperature during 13 h, and analysed by AFIFFF-MALS at: 3, 5, 7, 9, 11 and 13 h.

Fractionation and light scattering

The experimental set-up and procedures for AFIFFF were composed of an Eclipse 2 System (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany), connected to a DAWN-DSP laser Photometer (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, US), which is a Multiangle Light Scattering (MALS) detector with a laser wavelength $\lambda=633$ nm and a UV detector Agilent 1100. An Agilent 1100 Series Isocratic Pump (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with an in-line vacuum degasser and an Agilent 1100 Autosampler delivered the carrier flow and handled sample injection into the AFIFFF channel. A 0.1 μm in-line filter (VVLP, Millipore, Germany) was installed between the pump and the AFIFFF channel. The AFIFFF channel used a 250 μm thick Mylar spacer with a trapezoidal shape. The accumulation wall was an ultrafiltration membrane of regenerated cellulose with 5 kDa cut-off (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany). In all calculations, a 0.164 mL.g^{-1} refractive index increment was used. For concentration detection, the absorbance was measured at 214 nm and the UV extinction coefficient value was fixed at $1.27 \times 10^4 \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

The eluent used for AFIFFF-MALS analysis was a 2 mM sodium phosphate with 14 mM sodium chloride buffer, pH adjusted at 6.0 by addition of phosphoric acid (85.1 % v/v). The eluent was filtered before use (vacuum filtration system using Gelman filters of 0.1 μm).

The AFIFFF fractionation procedure consisted in three steps: injection, focus, and elution. For separation, the channel flow rate was fixed at 1 mL.min^{-1} and the cross-flow rate varied. During injection, eluent entered into the channel by inlet and outlet and was completely wasted by the cross-flow outlet. A first step consisted of fixing the cross-flow rate at 1.5 mL.min^{-1} . The flows and system pressure was then allowed 1 min to stabilize before sample injection into the channel. The sample volume injected was 30 μl at a flow rate of 0.2 mL.min^{-1} . After injection, 1 min of focus was kept before the elution started. In elution mode, the sample components were then eluted at 1.5 mL.min^{-1} during 6 min, and then the cross-flow rate decreased linearly during 7 min, followed by an elution at

0.2 ml.min⁻¹ for 40 min. The flow-rate through the detectors, V_{out} , was constantly maintained at 1 ml.min⁻¹.

Calculations of molecular weight number-average (M_n), weight-average (M_w) and mass fraction were performed using the ASTRA software (version 5.3.4.14, Wyatt technology, Santa Barbara, US).

RESULTS AND DISCUSSION:

The figure 1 illustrates a typical fractogram of a gelatin sample by AFIFFF-MALS at ambient temperature, with typical UV, light scattering (at 90°) and molar mass profiles. The molar mass of gelatin samples ranged from 2×10^4 to 3×10^7 g.mol⁻¹ which was in agreement with the results obtained by Fraunhofer, Winter and Coester (2004). This data confirmed the molar mass heterogeneity in the sample.

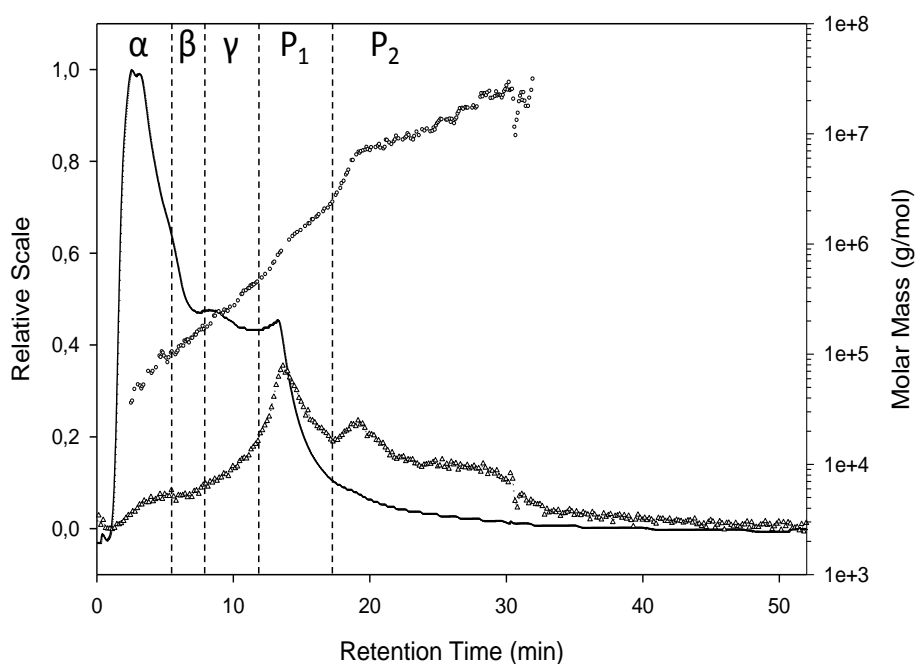


Fig.1. Fractogram from AFIFFF analysis of gelatin sample.

UV signal (solid line - left axis), 90° light scattering signal (triangle up - left axis) and calculated molar mass (open circle- right axis)

If the fractogram was divided into five parts, it was observable from 1 to 5 min a large UV response with a low MALS signal which is specific of small molecules that can be assigned to the α chains (monomers) with molar mass included between 5×10^4 and $1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. In the second part, from 5 to 7 min, the molecules with intermediate size were eluted with a decrease of signal UV indicating a less important quantity of molecules of intermediate-sized with a molar mass calculated from $1.2 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ to $2 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ which is in agreement with theoretical values of β chains (dimers). In the third section from 7 to 12 min the γ components (trimers) were eluted with molar mass from $200 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ to $400 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. The results are in agreement with those obtained by Meyer and Morgenstern (2003) with SEC-MALS technique, with α , β and γ chains around 90, 180 and $300 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ respectively.

A fourth section from 12 to 16 min, with a slight increase of UV signal standing for a significant proportion of molecules of hMW (P_1) was identified. Its molecular weight reached several 10^6 g.mol^{-1} which led to high scattering intensities. A low shoulder of UV signal was observed at high retention times (18 min) which highlighted the presence of P_2 particles of which the quantity was quite negligible. They had very hMW in the order of magnitude of $3 \times 10^7 \text{ g.mol}^{-1}$.

As showed in figure 2, NG was initially composed mostly of α , β , γ chains and in low quantity by hMW compounds P_1 and P_2 . During the incubation, as observed in figure 2 and showed in table 1, the quantity of α , β and γ chains decreased from 69.48 % to 45.83 %. At the same time, the quantity of P_1 and P_2 increased respectively from 21.28 % to 32.86 and 9.19 % to 21.28 %. As presented in table 1, these phenomena led to an increase of M_n and M_w with a small polydispersity modification.

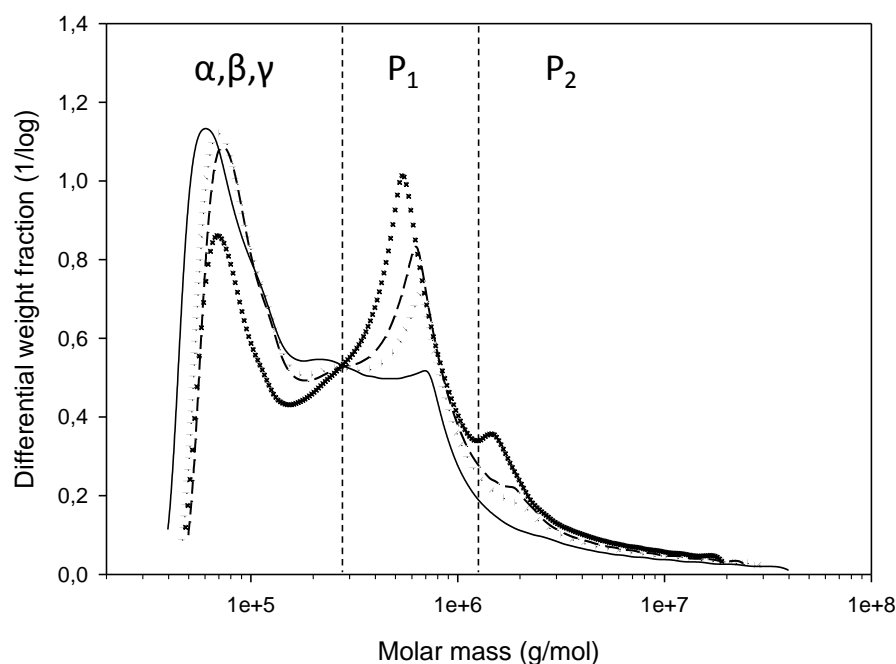


Fig.2. Differential weight fraction vs molar mass of NG sample during incubation: 3 hours (solid line); 7 hours (dotted line); 9 hours (small dash line); 13 hours (cross line)

As showed in figure 3 and table 1, TPG, as well as NG, were initially composed mostly of α , β , γ chains (68.29 %) and in low quantity by P1 hMW compounds (20.31 %). Thermal pre-treatment led to formation (11.38%) of P2 hMW compounds. As showed in figure 2 and 3, P1 and P2 molar mass in TPG ($7.5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$; $2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ respectively) was higher than P1 and P2 molar mass ($5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$; $1.5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ respectively) in NG. Thermal treatment led to P1 and P2 hMW compounds packing which led to a higher M_w value ($399.6 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) in initial TPG than in initial NG. On the contrary M_n was in the same order of magnitude for both samples (89.8 and $98.5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$), α , β , γ chains being main components. On TPG, during incubation, quantity of α , β and γ chains slightly decreased from 68.29 % to 64.45 %. At the same time, quantity of P1 and P2 slightly increased respectively from 20.31 % to 22.58 and 11.38 % to 12.94 %. These phenomena did not lead to significant M_n and M_w modifications.

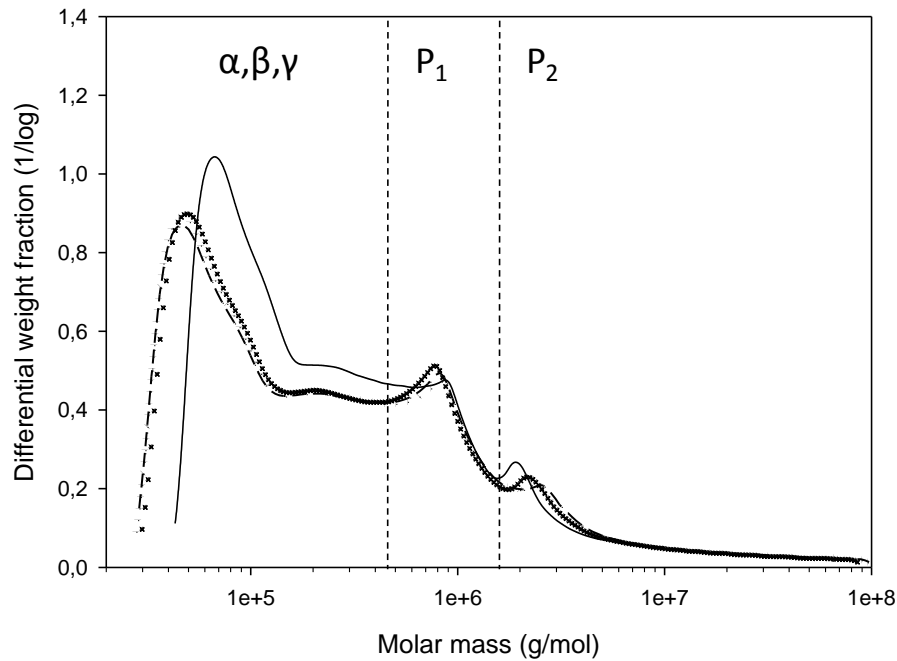


Fig.3. Differential weight fraction vs molar mass of TPG sample during incubation: 3 hours (solid line); 7 hours (dotted line); 9 hours (small dash line); 13 hours (cross line).

| Incubation time (hours) | Native Gelatin (NG) | | | | | Thermally Pre-treated Gelatin (TPG) | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|--|--|-------------------------------------|--------------|--------------|--|--|
| | % ($\alpha+\beta+\gamma$) | % P1 | % P2 | M_n (10^3 g.mol^{-1}) | M_w (10^4 g.mol^{-1}) | % ($\alpha+\beta+\gamma$) | % P1 | % P2 | M_n (10^3 g.mol^{-1}) | M_w (10^4 g.mol^{-1}) |
| 3 | 69.48 ± 1.89 | 21.28 ± 1.22 | 9.19 ± 0.69 | 98.5 ± 8.1 | 100.7 ± 5.0 | 68.29 ± 1.92 | 20.31 ± 2.01 | 11.38 ± 0.81 | 89.8 ± 8.0 | 399.6 ± 12.0 |
| 5 | 63.48 ± 2.09 | 25.27 ± 1.52 | 11.24 ± 0.58 | 81.2 ± 8.0 | 110.0 ± 4.4 | 67.16 ± 2.00 | 21.46 ± 1.80 | 11.36 ± 0.64 | 99.0 ± 9.0 | 407.0 ± 12.1 |
| 7 | 61.08 ± 1.53 | 26.03 ± 1.62 | 13.39 ± 0.61 | 94.8 ± 9.5 | 118.4 ± 5.9 | 66.30 ± 1.62 | 21.82 ± 0.90 | 11.86 ± 0.50 | 92.4 ± 8.3 | 418.3 ± 12.5 |
| 9 | 56.80 ± 0.81 | 28.00 ± 0.66 | 15.19 ± 0.15 | 116.6 ± 11.7 | 121.7 ± 7.3 | 64.83 ± 0.75 | 22.60 ± 0.78 | 12.58 ± 0.12 | 85.2 ± 7.7 | 463.4 ± 18.5 |
| 11 | 50.83 ± 0.40 | 30.60 ± 0.35 | 18.55 ± 0.74 | 132.1 ± 13.2 | 129.8 ± 6.5 | 64.32 ± 0.12 | 22.88 ± 0.52 | 12.78 ± 0.42 | 96.7 ± 8.7 | 443.5 ± 17.7 |
| 13 | 45.83 ± 0.05 | 32.86 ± 0.33 | 21.28 ± 0.29 | 139.5 ± 13.9 | 175.3 ± 8.8 | 64.45 ± 0.07 | 22.58 ± 0.33 | 12.94 ± 0.24 | 82.9 ± 7.5 | 418.3 ± 16.7 |

Table 1. Fraction ratio, Number average molar mass M_n and Weight average molar mass M_w (means ± SD) determined by AFIFFF-MALS in native gelatine (NG) and Thermally Pre-treated Gelatin (TPG) during incubation.

During the NG incubation at $2 \times 10^{-3} \text{ g.g}^{-1}$, we observed that the formation of P1 and P2 hMW compounds during incubation process could be an additional interaction between α , β ; γ chains which is supported by the decrease of α , β ; γ chains quantity and the simultaneous increase of P1 and P2 increase. These results are in good agreement with previous works describing gelatin renaturation. It is established (Djabourov, Leblond & Papon, 1988) that α , β and γ chains undergo a conformational coil to helix transition during which the chains of gelatin tend to recover the initial collagen structure, when the temperature is lowered below 35°C . As suggested by Harrington and Rao (1970), for

concentrations $c \leq 10^{-5}$, 10^{-6} g.g⁻¹, the process of renaturation is completely intramolecular by hydrogen bonding. Triple helixes are formed by reverse folding of the chains. This renaturation process in solution was directly observable by AFIFFF-MALS analysis either by the occurrence of a new peak and by the increase of the apparent molar mass M_w .

Regarding TPG, the association phenomenon was slightly lowered. It has been reported (Yannas & Tobolsky, 1967; Ward, 1977) that thermal treatment of gelatin film led to interactions between reactive side chain groups. This treatment can lead to the insolubility of gelatin as presented in our previous work (Rbii et al. 2009). This is explained by the formation of a three-dimensional network resulting from interchain cross-linking. It was described (Vassileva et al, 1998) that as a result of the intra- or intermolecular cross-linking between chain segments, a denser chain packing was achieved. Such a densification is observed in our work and could lead to insolubilisation. In our case, behavior of TPG during incubation indicated that thermal treatment of gelatin in powder diminished the ability of α , β and γ chains to undergo a conformational coil to triple helix. In aqueous solution, these cross-linked gelatin coil would not be able to unfold and rearrange themselves in triple helixes association. This cross-linking phenomenon is confirmed by the presence of hMW compound at 3 hours incubation. Marks, Tourtellotte and Andix (1968), who studied gelatin solubility behavior during accelerated ageing process, supposed that association of gelatin was probably due to hydrogen bonding and/or cross-linking. This cross-linking phenomenon can involve gelatin reticulation thanks to lysine reaction which can lead to its complete insolubilization. This latter phenomenon suggests a drastic change of gelatin conformation which prevents hydration of the molecules.

CONCLUSION

This study has shown the influence of a thermal pre-treatment applied on dry gelatin on the renaturation behavior. The use of AFIFFF-Mals permitted to quantify and determine molar mass of gelatin protein chains organization. For native gelatin, α , β , γ chains association into higher molar mass compounds has been showed. We also demonstrated the influence of dry gelatin pre-heating on its behavior in solution during renaturation process. In fact, after thermal pre-treatment, chains association is slowed down or blocked. It is now necessary to make an additional research to

characterize the chemical and/or physical phenomena that induces this lowering of chains association during incubation after pre-heating process.

Acknowledgements: the authors thank the Rousselot company and the French Ministry (ANRT) for financial support.

References

- Boedtker, H., & Doty, P. (1956).the native and denaturated states of soluble collagen. *Journal of the American Chemical Society*, 78(17), 4267-4280.
- Djabourov, M. Maquet, J. Theveneau, H., Leblond, J., & Papon, P. (1985). Kinetics of gelation of aqueous gelatin solutions. *British Polymer Journal*, 17 (2), 169-174.
- Fraunhofer, W., Winter, G., Coester, C. (2004). Asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering for analysis of gelatin nanoparticle drug carrier systems. *Analytical Chemistry*, 76(7), 1909-1920.
- Giddings, J.C., Yang, F.J., & Myers, M.N. (1977). Flow field-flow fractionation as a methodology for protein separation and characterization. *Analytical Biochemistry*, 81(2), 395-407.
- Harrington, W.F., & Rao, N.V. (1970). Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9 (19), 3714–3724.
- Ledward, D.A. (1986). Gelation of gelatin. In J.R. Mitchell, & D.A. Ledward (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp.171-201). London: Elsevier Applied Science.
- Lundin, L., Norton, I.T., Foster, T.J., Williams, M.A.K., Hermansson, A.-M., & Bergström, E. (2000). Phase separation in mixed biopolymers systems. In P.A. Williams, & G.O. Phillips, *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 167-180), Vol.10. Royal Society of Chemistry.
- Marks, E.M. Tourtellotte, D. Andux, A. (1968). The phenomenon of gelatin insolubility. *Food Technology*, 22, 1433-1436.

- Meyer, M., & Morgenstern, B. (2003). Characterization of gelatin and soluble collagen by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). *Biomacromolecules*, 4, 1727-1732.
- Olivares, M.L., Peirotti, M.B., & Deiber, J.A. (2006). Analysis of chain association in dilute aqueous solutions through viscosity data. *Food Hydrocolloids*, 20, 1039-1049.
- Pezron, I., Djabourov, M. & Leblond, J. (1990). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A light and small-angle neutron scattering study. *Polymer*, 32 (17), 3201-3209.
- Piez, K.A. (1967). *In Treatise on Collagen*. Academic Press: New York.
- Rbii, K., Violleau, F., Guedj, S., & Surel, O. (2009). Analysis of aged gelatin by AFIFFF-MALS: Identification of high molar mass components and their influence on solubility. *Food Hydrocolloids*, 23, 1024-1030;
- Vassileva, E., Baltá-Calleja, F. J., Cagiao, M. E., Fakirov, S. (1998) Gelatin films with very high surface hardness. *Macromolecular Rapid Communications*. 19 (9), 451-454.
- Veis, A. (1964). *The macromolecular chemistry of gelatin*. Academic Press: London.
- Viebke, C., & Williams, P.A. (2000). Determination of molecular mass distribution of κ 20 carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field flow fractionation. *Food Hydrocolloids*, 14, 265-270.
- Wahlund, K.G., Gustavsson, M., MacRitchie, F., Nylander, T., & Wannerberger, L. (1996). Size characterisation of wheat proteins, particularly glutenin, by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Cereal Science*, 23, 113-119.
- Ward, A.G., & Courts, A. (1977). *The science and technology of gelatin*. London: Academic Press.
- Yannas, I. V., & Tobolsky, A. V. (1967). Cross-linking of gelatine by dehydration. *Nature (London)* 215, 509-510.

III. Bilan du suivi de renaturation de la gélatine par AF1FFF-MALS

A. Gélatine native :

Comme le montre la publication, l'AF1FFF-MALS permet de détecter et de suivre le phénomène de réorganisation de la gélatine en solution. Une évolution des profils UV est constatée, différente de celle observée après le vieillissement accéléré, ce qui confirme que les phénomènes impliqués au cours du vieillissement et de la renaturation ne sont pas les mêmes *Figure 24*.

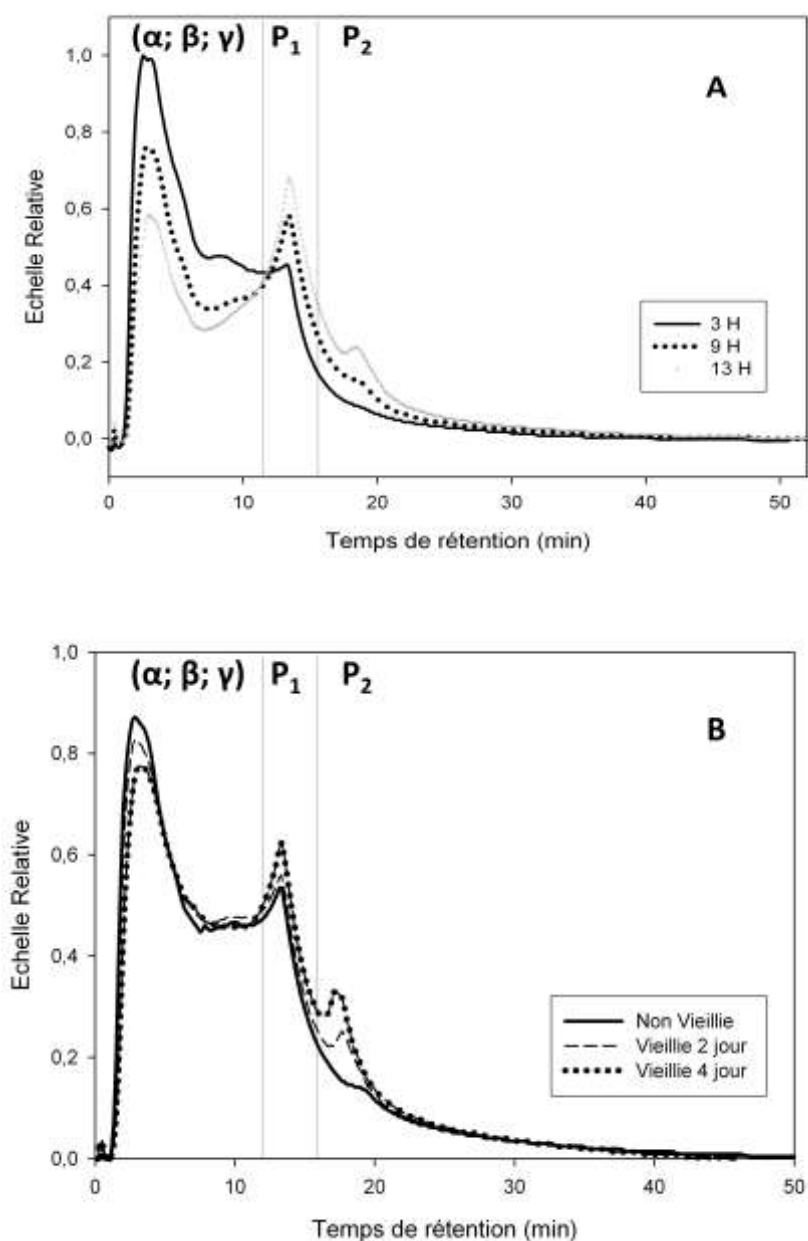


Figure 24: Fractogramme UV de la gélatine A : pendant la renaturation ; B : après le vieillissement accéléré

Sur la *Figure 24 A*, on peut voir une diminution de la fraction (α , β , γ), au cours du temps, ainsi qu'une forte augmentation des fractions protéiques de hauts poids moléculaires (P_1 , P_2) ce qui conduit à une évolution de la masse moléculaire au cours du temps. Alors que le seul phénomène réellement observé au cours du vieillissement accéléré est l'apparition d'une nouvelle population P_2 , dont la proportion ne cesse d'augmenter en fonction du temps de vieillissement (*Figure 24 B*), jusqu'à faire apparaître de l'insolubilité.

B. Gélatine vieillie

Afin de comprendre ce qui se produit au cours d'un vieillissement accéléré, nous avons suivi la renaturation d'une gélatine vieillie pendant 2 jours par AFIFFF-MALS. Il est intéressant de noter, que cette gélatine traitée thermiquement, ne présente pas le même comportement qu'une gélatine non vieillie en solution au cours du temps.

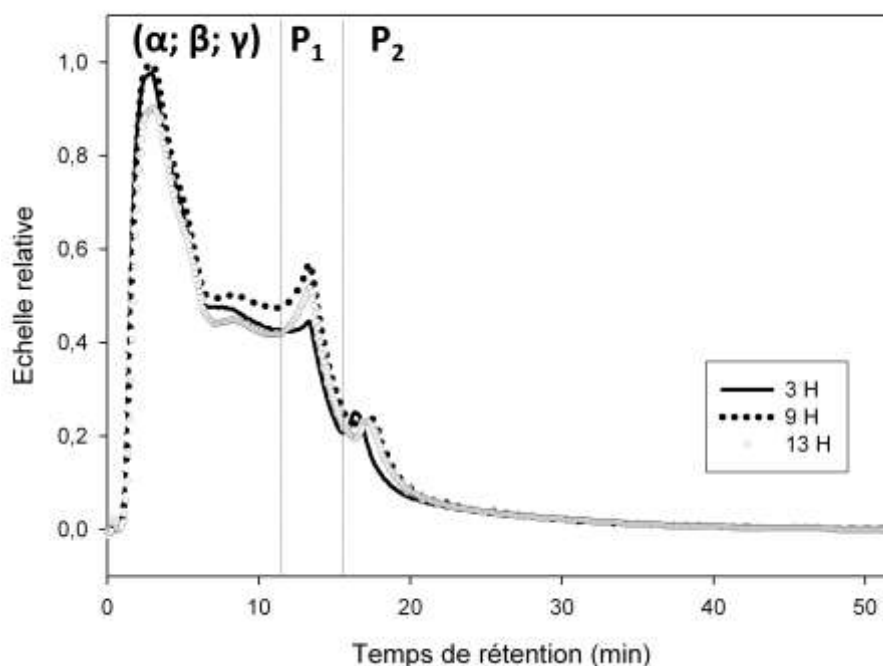
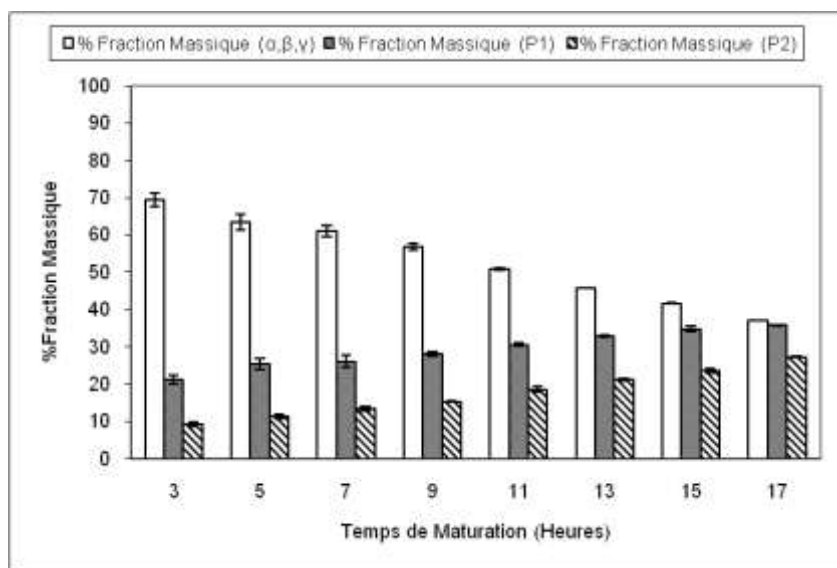


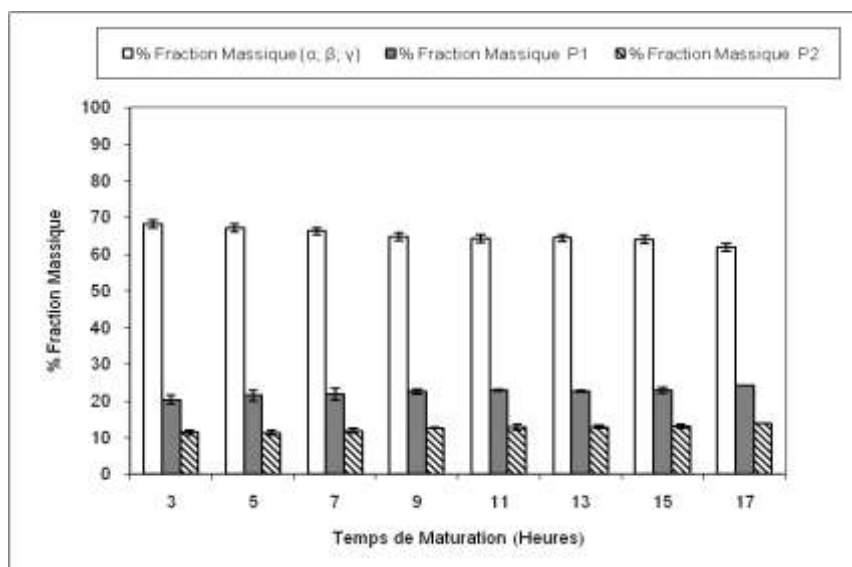
Figure 25: Fractogramme UV d'une gélatine vieillie

Outre le fait de présenter dès le départ une population P_2 plus importante qu'une gélatine non vieillie, la gélatine vieillie ne présente pratiquement pas d'évolution de profil UV au cours du temps (*Figure 25*). Ceci s'observe d'autant plus sur la *Figure 26* qui représente le pourcentage massique de chaque fraction protéique contenue dans les solutions de gélatine au cours du temps. Une renaturation qui se traduit par la diminution des fractions (α , β , γ) au

détriment des fractions P_1 et P_2 dans la gélatine non vieillie, mais une renaturation qui est très ralentie, voir bloquée dans la gélatine vieillie.



A



B

Figure 26: Evolution des fractions massique en fonction du temps de maturation A: gélatine native; B: gélatine vieillie

Ces résultats permettent de conclure dans un premier temps, que l'AFIFFF-MALS est un outil analytique qui permet de détecter et de suivre le phénomène de réorganisation de la gélatine en solution au cours du temps. Ce changement de conformation et d'organisation de la gélatine, principalement dû à des liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires, montre l'implication des différentes fractions dans la formation d'agrégats, induisant une augmentation

de la masse moléculaire. Ces résultats sont en accords avec des travaux réalisés auparavant, qui décrivent la renaturation de la gélatine en solution (Djabourov *et al.*, 1985). On peut supposer que la diminution des fractions (α , β , γ) observée par AFIFFF-MALS, au cours du temps, est due à une réorganisation et/ou à un changement de conformation de ces chaînes qui vont ensuite s'agréger pour former des particules/agrégats de hauts poids moléculaires (P_1 , P_2).

Dans un deuxième temps, ce qu'il est important d'observer est cette différence de profil entre une gélatine après renaturation et une gélatine vieillie. Des profils différents qui nous amènent à penser que les phénomènes impliqués ne sont pas les mêmes. On peut donc supposer que le vieillissement de la gélatine n'est pas dû à une renaturation de celle-ci en solution. Comme évoqué dans des travaux précédents (Rbii *et al.*, 2009), le vieillissement de la gélatine serait le résultat de réticulations intra et intermoléculaires des chaînes, aboutissant à la formation de particules de très hauts poids moléculaires.

Un des points très intéressant de cette étude est le comportement complètement différent d'une gélatine vieillie face aux phénomènes de renaturation, comme si le traitement thermique bloquait la renaturation, comme si l'aptitude des chaînes (α , β , γ ,) à changer de conformation pelote-hélice était ralentie ou bloquée. On peut supposer que le traitement thermique appliqué durant le vieillissement, induit un changement de conformation des chaînes, qui les empêche de se réorganiser ou d'évoluer au cours du temps, notamment pour former par association des chaînes et des agrégats de hauts poids moléculaires.

C. Polarimétrie

Afin de confirmer les résultats observés par AFIFFF-MALS et voir si le traitement thermique appliqué sur les échantillons de gélatine au cours du vieillissement, ralentit ou bloque la renaturation des chaînes en solution, cette étude a été complétée par des mesures de polarimétrie. La mesure du pouvoir rotatoire des solutions ou des gels de gélatine est une technique extrêmement sensible qui permet de détecter et de quantifier le changement de conformation pelote-hélice (Annexe 1).

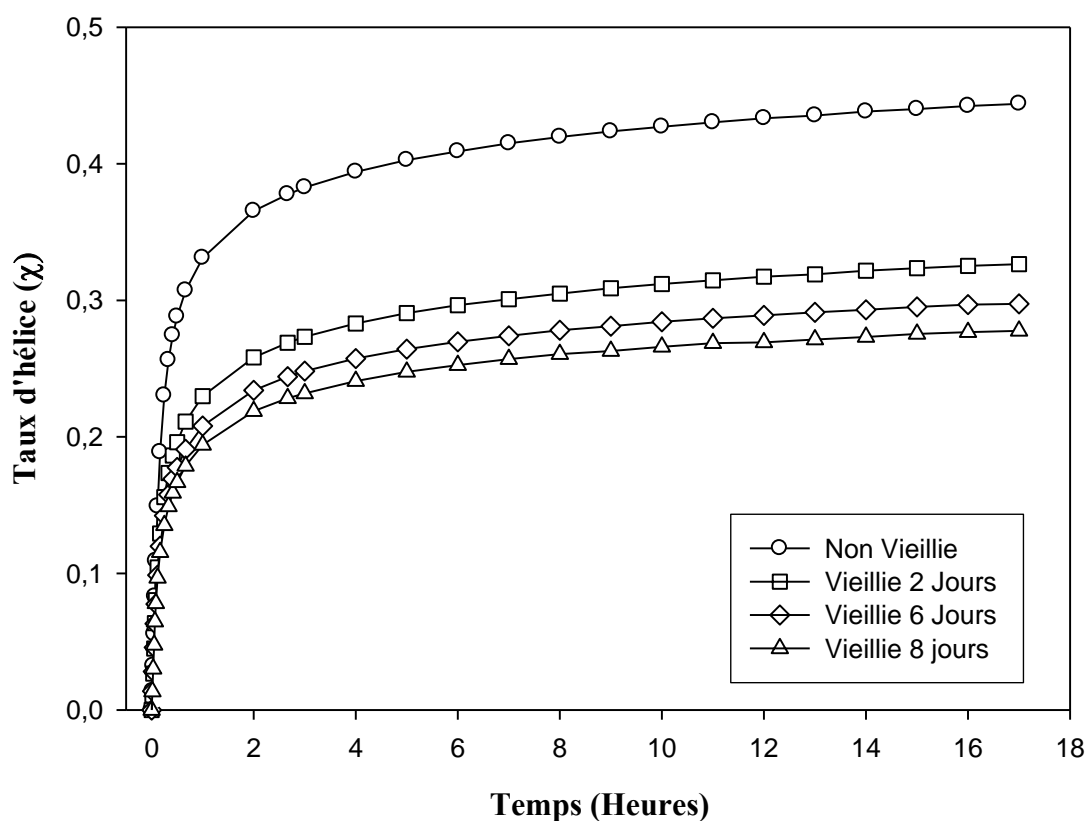


Figure 27: Evolution du taux d'hélices en fonction du temps

Comme le montre la *Figure 27*, une forte diminution du taux d'hélicité est observée suite au traitement thermique appliqué au cours du vieillissement, avec une diminution de l'ordre de 36 % du taux d'hélicité à 17h de maturation entre la gélatine non vieillie et vieillie 8 jours.

Cette diminution du taux d'hélicité observée par polarimétrie, confirme les résultats obtenus par AFIFFF-MALS et permet de supposer que le traitement thermique appliqué au cours du vieillissement induit une réorganisation de certaines chaînes et la formation, notamment dans le cas des chaînes α , de liaisons intra ou intermoléculaires de types covalentes et/ou liaisons hydrogènes, les empêchant de se réorganiser en triple hélice en solution.

Le traitement thermique limite la renaturation partielle des triples hélices de collagène (*Figure 28*).

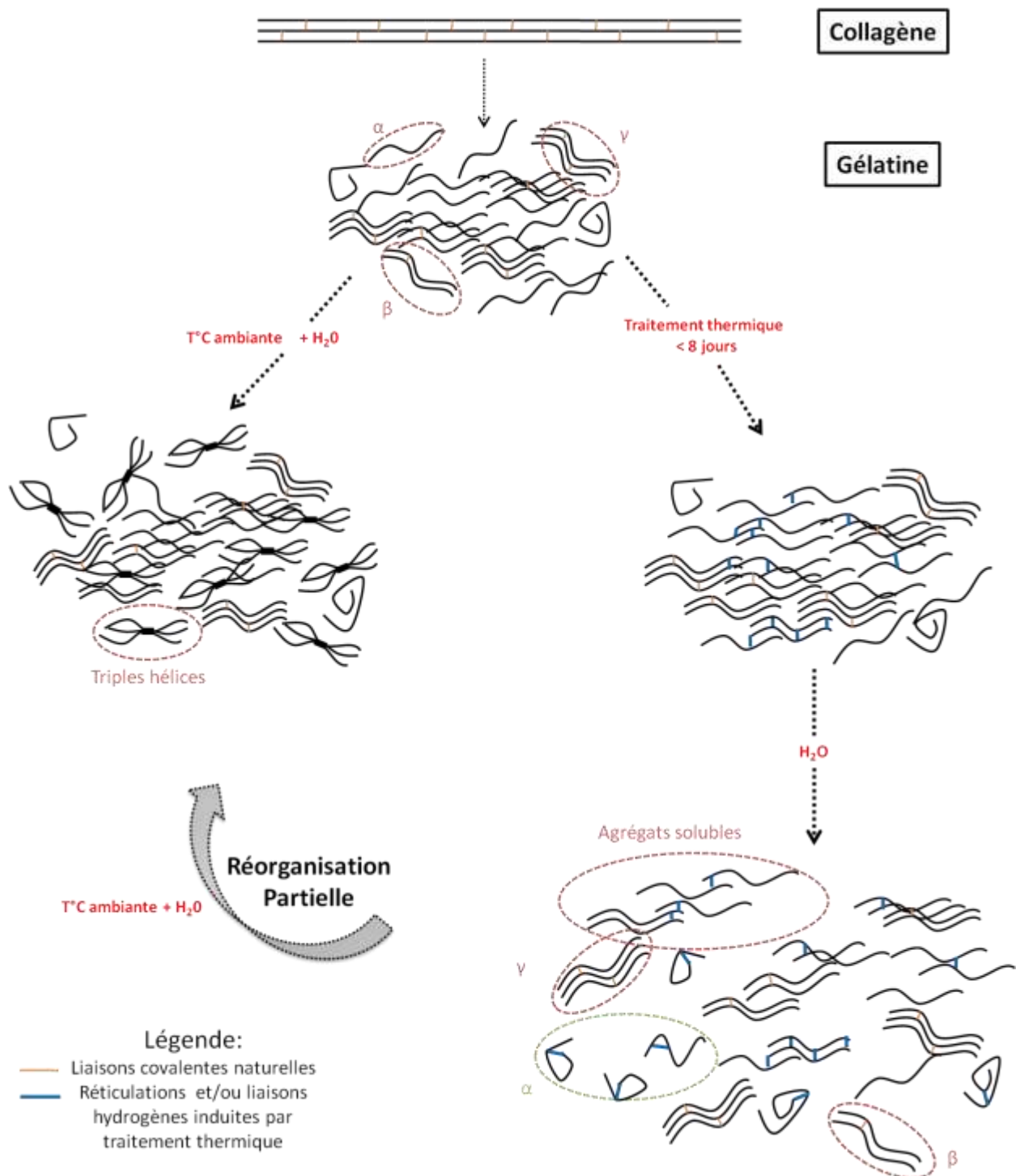


Figure 28: Réorganisation partielle en triple hélice de la gélatine après un vieillissement accéléré

Ce qu'il est important de comprendre maintenant est le mécanisme chimique qui induit ce changement de comportement après un traitement thermique, cet aspect est abordé dans le

chapitre V, avec notamment le rôle de la lysine dans la compréhension du mécanisme à l'origine de l'insolubilité.

*Chapitre V : Compréhension du mécanisme à l'origine de
l'insolubilité*

I. Introduction

On a mis en évidence dans le chapitre III et IV, que l'insolubilité au cours d'un vieillissement accéléré, induisait l'apparition d'agrégats de hauts poids moléculaires, et que celle-ci n'était pas due à une renaturation de la gélatine. Il est important maintenant de comprendre le mécanisme à l'origine de la perte de solubilité, et notamment, lorsque celle-ci apparaît naturellement, sans ajouts d'agents réticulants.

De nombreux mécanismes ont été décrits pour expliquer l'insolubilité, notamment dans les gélules de médicaments après ajout d'agents réticulants (cf. Chapitre I). Un des acides aminés souvent impliqué dans la réticulation, notamment des films de gélatine, est la lysine. En effet, des études de réticulation chimique de films de gélatine, en présence de glutaraldéhyde et de formaldéhyde, ont montré que la présence de la lysine favorisait la réticulation et induisait une perte de solubilité (Brown *et al.*, 1996, Cravalho & Grosso, 2006, Ofner *et al.*, 2001). On peut donc supposer que la lysine joue un rôle important dans la perte de solubilité, ainsi que dans la formation des agrégats.

Dans nos essais, au cours du vieillissement, la gélatine subit un traitement thermique, aboutissant à l'apparition d'insoluble. Le traitement thermique induit un changement de couleur (Figure 29), associé à une forte odeur.

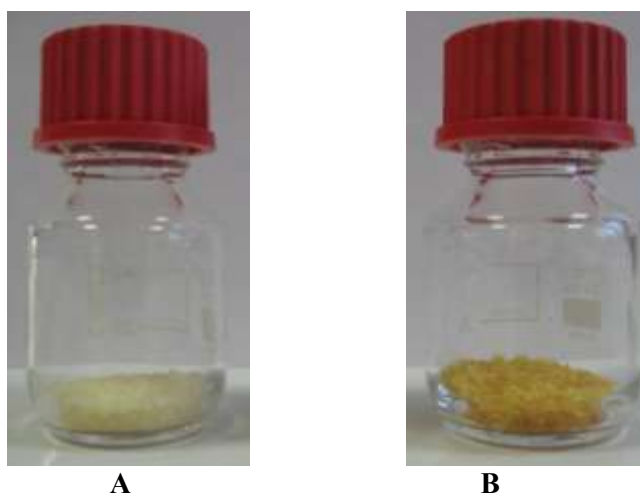


Figure 29: Vieillissement accéléré de la gélatine: A. 0 jour ; B. 30 jour

Comme on peut le voir sur la Figure 29, un fort brunissement est observé après le vieillissement accéléré. Une des réactions à l'origine du brunissement et responsable notamment d'odeurs est la réaction de Maillard, qui est souvent observé en présence de lysine.

La réaction de Maillard (ou brunissement non enzymatique), est un processus chimique complexe partant d'un composé aminique (généralement des acides aminés) et d'un composé carbonyle (généralement un glucide). Les processus mènent à la formation de systèmes complexes, hétérocycles et polymères solubles ou insolubles (le plus souvent de couleur brune). La réaction de Maillard, modifie la structure des protéines, aussi bien chimique que stérique. Elle a lieu lors du stockage ou, plus fréquemment, lors de processus par traitements thermiques. Elle est également responsable de la formation de couleurs, d'antioxydants, et d'agents cancérigènes. Elle réduit de manière drastique la valeur nutritionnelle des aliments en diminuant la concentration et donc la disponibilité des acides aminés essentiels. L'apparition d'une couleur brune distincte et d'un arôme associé est caractéristique de cette réaction. La température, le temps de réaction, la teneur en eau ainsi que la concentration et la nature des précurseurs influencent la réaction de Maillard.

Il a été relaté que la réaction de Maillard pouvait apparaître également comme intervenant dans les processus de lente dégradation du collagène (Machiels & Istasse, 2002). D'une façon générale, dans les produits alimentaires, la réaction se déroule soit entre les saccharides et des protéines (ou acides aminés libres), soit entre des aldéhydes (résultant de l'oxydation des acides gras non saturés) et des protéines (ou acides aminés libres). La réaction avec les protéines est rendue possible par la présence de groupements NH_2 libres situés aux extrémités des molécules *Figure 30*.

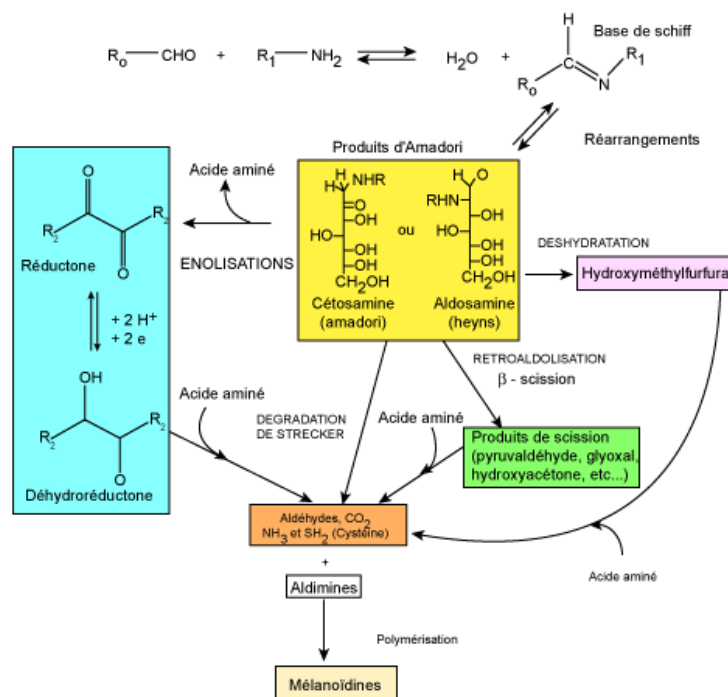


Figure 30: Réaction de Maillard (Biochem-Agro)

La réaction de Maillard fait intervenir un nombre complexe de réactions et, malgré un travail important déjà réalisé pour comprendre les différents mécanismes, nombreux sont encore ceux qui restent à l'état d'hypothèses (Moll, 1993).

Comme on a pu le voir lors du vieillissement accéléré de la gélatine, une forte coloration apparaît. La nature de l'acide aminé, ainsi que la position des groupements aminés sur celui-ci, interviennent dans le mécanisme de coloration : plus la chaîne de l'acide aminé est longue et, surtout, plus la fonction NH_2 est éloignée du carboxyle, plus le brunissement est intense (Tableau 5).

Tableau 5: Rôle de la nature de l'acide aminé sur le brunissement au cours de la réaction de Maillard (d'après Lento et al., 1960)

| | | | <u>D.O</u> |
|-----------|---------------|---------------------------------------|-------------------|
| Glucose + | Glycine | (2C- α aminé) | 0.64 |
| | alpha alanine | (3C- α aminé) | 0.77 |
| | bêta alanine | (3C- β aminé) | 2.00 |
| | norleucine | (6C- α aminé) | 1.20 |
| | lysine | (6C- α et ε aminé) | 4.10 |

Pour ces raisons, la lysine est responsable d'une coloration 6,5 fois plus importante que la glycine, du fait d'une chaîne plus longue et d'une fonction NH_2 plus accessible. Ces éléments soulignent l'intérêt de déterminer le rôle de la lysine dans l'apparition de l'insolubilité au cours du vieillissement.

De nombreuses études ont été réalisées pour doser la lysine disponible dans les céréales comme le blé, le riz, l'orge, le seigle, l'avoine, le maïs, le millet, le sorgho, entre autres (Fernandez-Artigas *et al.*, 1999 ; Ramirez-Jimenez *et al.*, 2004 ; Torbatinejad *et al.*, 2005), ainsi que dans les protéines contenues dans le lait infantile en poudre ou liquide (Albala-Hurtado *et al.*, 1997 ; Rufian-Heranes *et al.*, 2006). D'autres études ont été réalisées sur des protéines pures d'origines animales ou végétales (Castillo *et al.*, 1997 ; Carpenter, 1966). Ces études ont amené les auteurs à discuter sur la mise au point d'une méthode optimale, permettant de quantifier de façon exacte et répétable, la lysine disponible dans les protéines (Figure 31).

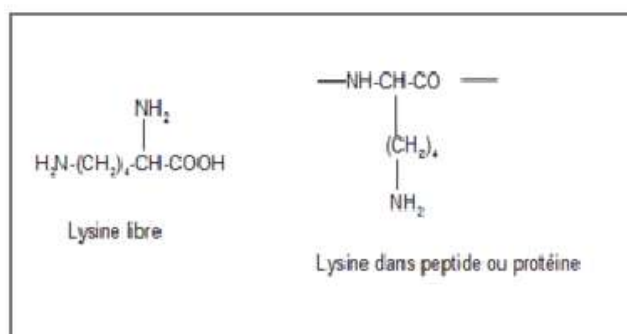


Figure 31: Formules chimiques de la lysine et de sa forme disponible.

La présence d'un groupe ϵ -amine fait intervenir la lysine dans des réactions d'agrégaions (différentes des liaisons peptidiques), avec d'autres acides aminés de la chaîne protéique, ou simplement avec d'autres composés contenus dans l'aliment (comme les sucres dans le cas de la réaction de Maillard). La quantité de lysine qui n'a pas participé à ces réactions, est évaluée par rapport à la quantité totale de protéine, ce qui permet d'établir le contenu de lysine disponible.

De nombreuses méthodes, directes et indirectes, ont été adaptées pour la détermination de la lysine disponible présente dans les aliments. L'évaluation de la lysine disponible par analyse biologique de la croissance chez les rats est une méthode indirecte avec un coefficient de variation important (Fernandez-Artigas *et al.*, 1999). D'autre part les techniques chimiques de dosage sont pour l'essentiel, fondées sur la réaction entre une molécule donnée et le groupement ϵ -amine : les plus connues sont l'acide 2,4,6-trinitrobenzenosulfoné (TNBS) et le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) (Friedman, 1982 ; Kakade & Liner, 1969). A ces deux méthodes s'ajoutent la titration par le formol, le « dye-binding » (c'est-à-dire l'utilisation de colorants spécifiques) (Mohamed & Stainsby, 1984) ainsi que la guanidination (Rutherford & Moughan, 1990 ; Torbatinejad *et al.*, 2005 ; Moughan & Rutherford, 1996).

Les méthodes chimiques les plus utilisées sont la guanidination et la méthode de dérivation avec le FDNB. La méthode de la guanidination est basée sur la conversion de la lysine présente dans la protéine en homoarginine. Le principal désavantage de cette méthode est qu'une valeur élevée de pH est requise, induisant des réactions non désirées telle que la désulfurisation, la racémisation, et la formation de lysinoalanine. D'autres désavantages, liés à la guanidination sont, la durée de réaction trop longue, une réaction parfois incomplète et la

nécessité de concevoir des conditions spécifiques de réaction pour chaque protéine (Friedman, 1982). Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'utiliser la méthode au FDNB.

II. Méthode de détermination de la lysine disponible avec FDNB

De précédentes recherches ont développé une méthode, utilisant le FDNB dans la détermination de la lysine disponible contenue dans les protéines des produits alimentaires comme les céréales ou le lait. Ces études ont permis d'établir une bonne corrélation entre le contenu de lysine disponible et la valeur biologique d'une protéine (Kakade & Liner, 1969). Le réactant, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) a été utilisé dans l'évaluation des groupes ε -amines et leurs implications fonctionnelles dans l'activité biologique des protéines.

Dans le cas spécifique de la lysine, la réaction de dérivation avec le FDNB peut être effectuée entre le groupe 2,4-dinitrobenzène et les groupes α et ε -amine de l'acide aminé. Etant donné que la lysine disponible dans la gélatine, ne contient que le groupe ε -amine débloqué, la dérivation donne comme produit le N_ε -dinitrophenyl-L-lysine (N_ε -DNP-Lys) (Figure 32).

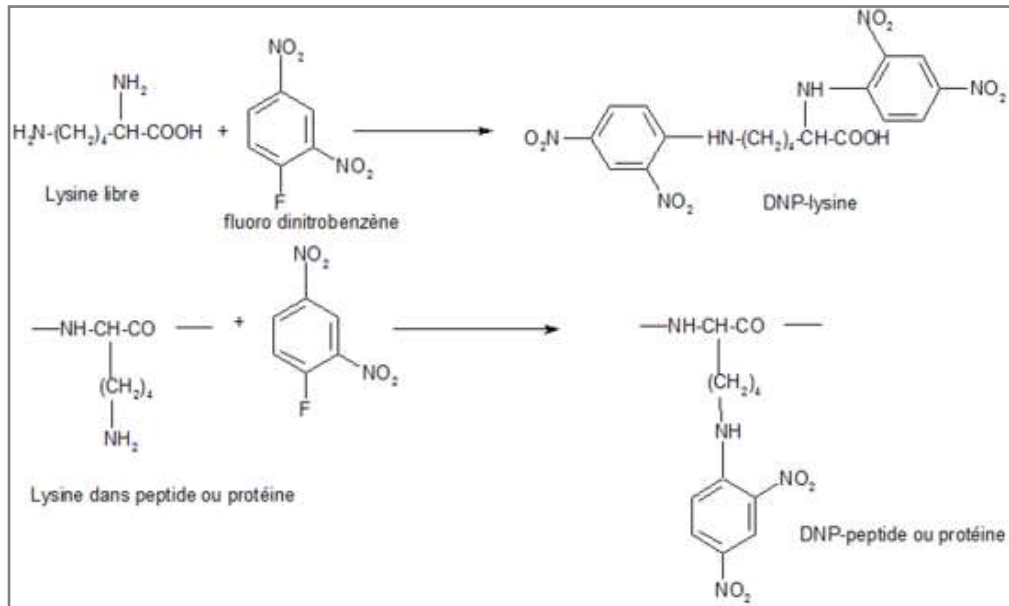


Figure 32: Réaction de dérivation de la lysine disponible avec FDNB

Ce produit peut être détecté par spectrophotométrie, suite à une hydrolyse acide (Carpenter, 1966 ; Blom *et al.*, 1967) et une extraction. Cette dernière étape est très importante, elle permet de séparer la lysine dérivée des autres acides aminés qui ont réagi avec le FDNB, ex. la L-

Arginine qui présente aussi des groupes amines et peut donner lieu à la formation de DNP-L-Arginine (Ramirez-Jimenez *et al.*, 2004 ; Carpenter, 1966 ; Friedman, 1982). De la même façon cette étape permet d'éliminer l'excès de réactant, ainsi que les composés secondaires formés pendant l'hydrolyse (Castillo *et al.*, 1997).

Un des inconvénients de cette méthode est l'interférence possible des glucides présents dans l'aliment sur la réaction de dérivation, ce qui peut contribuer à une estimation parfois incorrecte du contenu de lysine disponible (Friedman, 1982).

Plusieurs méthodes chromatographiques ont été proposées pour quantifier le N_ε-DNP-Lys. La technique qui permet d'avoir la meilleure quantification est l'HPLC (High-performance liquid chromatography).

Dans la bibliographie, diverses conditions d'analyse ont été utilisées (longueur d'onde, pH de la phase mobile, type et proportions des solvants, etc.) par HPLC pour arriver à quantifier le N_ε-DNP-Lys du mélange de la réaction après extraction.

III. Détermination du taux de lysine libre dans la gélatine durant le vieillissement accéléré

Aucune étude n'a été réalisée sur la détermination du taux de lysine libre dans la gélatine à partir du FDNB. Cela a donc nécessité au préalable de mettre en place une méthode utilisant le FDNB pour quantifier celle-ci par HPLC.

Une fois la méthode mise en place, l'objectif était de mettre en évidence l'implication de la lysine dans les phénomènes décrits précédemment.

Cette étude a fait l'objet d'une publication : Khalid Rbii, Maria-Angélica Usta-Bony, Frédéric Violleau, Noëlle Brambati, Anne-Marie Buchert, Olivier Surel: "Quantification of available lysine in gelatin by LC-UV : influence on molar mass and ability to helixes formation of thermally treated gelatin". *Food Hydrocolloids* (soumise).

Quantification of available lysine in gelatin by LC-UV: influence on molar mass and ability to helixes formation of thermally treated gelatin

Khalid Rbii^{1,2}, Maria-Angélica Usta-Bony¹, Frédéric Violleau^{1*}, Noëlle Brambati², Anne-Marie Buchert², Olivier Surel¹

¹ Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie ; UPSP/DGER 115; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

² Rousselot Isle sur la Sorgue SAS, F-84800 L'Isle sur la Sorgue, FRANCE

* Corresponding author. Tel: +33 5 61 15 29 78.

E-mail address: frederic.violleau@purpan.fr (F. Violleau)

Abstract

Lysine plays a very important role in gelatin properties. Quantification of available lysine in gelatin sample by LC-UV has been developed. Available lysine (AL) content, weight average molar mass (Mw) and kinetic of α helixes formation have been determined in thermally treated gelatin (75°C) during 2, 6 and 8 days. Thermal treatment during 8 days led to a decrease of AL content from 3.10 to 2.27 g/ 100g of gelatin. In the same time, Mw increased from 6.7×10^5 g.mol⁻¹ to more than 2.0×10^6 g.mol⁻¹ and α helixes formation ability was strongly affected. Thermal treatment leads to reaction of available lysine group with other functions present in its environment. Intermolecular cross-links led to a high molar mass compounds formations. Intermolecular cross-links are also present and the limit protein chain unfolding, an essential step for helixes formation.

Keywords: Gelatin; Lysine, LC-UV, thermal treatment, helixes

Introduction

Lysine measurement has been receiving much attention because the limiting essential amino acid in many foodstuff, and the ϵ -amino group in that amino acid facilitates the participation of lysine in degradational reactions affecting the proteins in foodstuffs during heat processing and storage.

Indeed, the ϵ -amino group of lysine can react with other compounds, particularly reducing sugars, rendering the lysine nutritionally unavailable (Hurrel, & Carpenter, 1981; Hopkins, 1981). During heat treatment, in some food, non-enzymatic browning, known as the Maillard reactions can occur between reducing carbohydrates and lysine and/or other amino acids including dairy products (Rufián-Henares, Guerra-Hernández, & García-Villanova, 2005).

Various chemical methods have been developed to measure available lysine present in processed and stored foods. They employ several reagents with variable specificity for the ϵ -amino group of lysine. The derivatization reaction most extensively used to determine available lysine was developed by Carpenter (1960) using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB). The derivative formed is N ^{ϵ} -dinitrophenyl-lysine (N-DNP-Lys), which can be measured spectrophotometrically after acid hydrolysis and extraction. Furthermore, the derivatization reaction is not specific for lysine and the carbohydrates present can lead to the formation of interfering compounds that cause an incorrect estimation of lysine content. In order to separate ϵ -DNP-Lysine from interfering amino acids and other compounds, a High Performance liquid Chromatography (HPLC) technique can be applied (Rabasseda, Rauret, & Galceran, 1988). This technique has never been applied for quantification of available lysine in gelatin, an important industrial biopolymer used in pharmaceutical, food and photographic manufactures.

The main interest for gelatin, is its ability to form gel at ambient temperature (Harrington et al, 1970 ; Djabourov et al, 1985) due to a renaturation process. Amino acid composition, specially lysine content is very important in gelatin properties. For example, many researchers (Brown, Madit, Cole, Wilding, & Cadé, 1996; Cravahlo, & Grosso, 2006; Ofner, Zhang, Jobeck, & Bowman, 2001) have sought evidence concerning the important role of lysine in gelatin by chemical reaction with

gluteraldehyde and formaldehyde. These chemical reactions lead to an insoluble cross-linked gelatin (Chafetz, Hong, Tsilifonis, Taylor, & Philip, 1984; Meyer et al. 2000). Without chemical reagent, gelatin can also become insoluble. Marks et al. (1968), Rbii, Violleau, Guedj and Surel (2009), who study gelatin solubility behaviour during thermal treatment, considering that insolubility appears to be an aggregation of gelatin molecules. In recent works, we have demonstrated that during thermal treatment at 75°C, an aggregation phenomenon occurred, in which small molecules gradually aggregate and produce a larger structure which could alter solubility. Concerning the reaction at the origin of this phenomenon many hypotheses have emerged, notably the formation of interchain amide links and the preponderant role of lysine (Yannas, & Tobolsky, 1967). Unfortunately, implication of available lysine in these phenomenons has never been studied.

Also, the aim of this study was (i) to develop a chromatography method permitting to determine available lysine in gelatin by FDNB derivatization in gelatin, (ii) to determine the behaviour of available lysine during gelatin thermal treatment at 75°C and (iii) to evaluate role of lysine on aggregation and renaturation process.

Materiel and methods

Chemicals: N-ε-2,4-DNP-Lysine (Sigma; D0380), Fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) (Sigma Chemical Co), ammonium acetate and sodium bicarbonate were analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (l'Isle d'Asbeau, France). Gelatin used was kindly provided by the Rousselot S.A.S (Isle sur la Sorgue, France) with the same physical properties presented in the previous work (Rbii et al, 2009).

Solvents: Ethanol (anhydrous), Methanol and di-ethyl ether (HPLC grade) were purchased from Carlo Erba Reagents-SDS (Val de Reuil, France). Deionized water ($\leq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistivity) was obtained from Millipore Simplicity water system (Molsheim, France).

Gelatin thermal treatment

Six grams of native dry gelatin powder were left in 50 mL glass bottles. The bottles were closed hermetically and left in an oven at 75°C for 2, 6 and 8 days. Each experiment was repeated twice.

Determination of available lysine by LC-UV

Derivative reagent: A 10% solution of 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) (Sigma Chemical Co) in ethanol was freshly made daily. FDNB is a powerful skin irritant and extreme care should be exercised in handling this compound.

Standards preparation: The standard solution was prepared by dissolving of 100 mg.ml⁻¹ of N-ε-2,4-DNP-Lysine (Sigma; D0380) in methanol/ water (1:4) mixture. The standard solution was diluted 1:100 in methanol/0,01 M ammonium acetate, pH 5, buffer (30/70). Working solutions of 50, 200, 350, 500, 650 and 800 mg.l⁻¹ were prepared by dilution of the standard solution and filtered through an 0,2 µm disc filter. Three replications were performed for all determinations.

Sample preparation: A 1g sample was placed in the bottom of 50 ml (Teflon) with PTFE-faced septa. Then, 34 ml of 8% (w/v) sodium bicarbonate solution was added and the content was thoroughly mixed during 10 min. 50 ml of 10% FDNB solution were added to the digestion flasks, which were then stoppered, protected from light and shaken for 2 h on a magnetic plate at room temperature. Ethanol was evaporated by evaporator *EZ 2 plus* (Genevac limited, Ipswich, United Kingdom). The digestion flasks were washed with 35 mL of diethylether to eliminate the unreacted FDNB.

The FDNB derivate solutions were hydrolyzed with 67 mL of 6M HCl in an oven at 110°C for 24 h, after the removal of CO₂ by stirring. The hydrolysed solutions were filtered with Whatman paper Number 541. The unreacted FDNB present in the filtrate was removed by diethyl ether extraction. The solution had been diluted 1:4 in mobile phase. Before the injection, each sample was filtered through 0.20 µm.

Chromatographic conditions: Fifteen microlitres of filtered solution were separated on a reverse-phase C₁₈ HPLC column (Luna C₁₈, 250x4,6 mm, particle size 5µm- Phenomenex - Le Pecq) thermostated at 45°C. The mobile phase was methanol: 0.01 M ammonium acetate, pH 5, buffer (30:70). The elution was isocratic and the flow was 2 ml.min⁻¹. The U.V. detector was set at 360 nm. The run time was 18 min and ε-DNP-Lysine was completely separated in 9 min. The determination of ε-DNP-Lysine was carried out by the external standard method. The concentration range was 50-800 mg.l⁻¹.

The quantity of available lysine (AL) is expressed for 100g of gelatin (g/100g of gelatin)

Molar mass determination by AFIFFF-Mals

The samples were prepared as follows. First the gelatin powder (thermally treated or not) was subjected to a hydration step with de-ionised water (resistivity of 18.2 MΩcm) for 1 hour in order to allow the gelatin powder to swell. Then the mixture was heated in a water bath at 55°C until it was completely melted. One millilitre of the solution was added to 9 mL of eluent used during AFIFFF-MALS analysis.

The eluent used for AFIFFF-MALS analysis was a 2 mM sodium phosphate with 14 mM sodium chloride buffer, pH adjusted at 6.0 by addition of phosphoric acid (85.1 % v/v). The eluent was filtered before use (vacuum filtration system using Gelman filters of 0.1µm).

The experimental set-up and procedures for AFIFFF were composed of an Eclipse 2 System (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany), connected to a DAWN-DSP laser Photometer (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, US), which is a Multiangle Light Scattering (MALS) detector with a laser wavelength λ=633 nm and a UV detector Agilent 1100. An Agilent 1100 Series Isocratic Pump (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with an in-line vacuum degasser and an Agilent 1100 Autosampler delivered the carrier flow and handled sample injection into the AFIFFF channel. A 0.1 µm in-line filter (VVLP, Millipore, Germany) was installed between the pump and the AFIFFF channel. The AFIFFF channel used a 250 µm thick Mylar spacer with a trapezoidal shape. The

accumulation wall was an ultrafiltration membrane of regenerated cellulose with 5 kDa cut-off (Wyatt Technology Europe, Dernbach, Germany). In all calculations, a 0.164 mL.g^{-1} refractive index increment was used. For concentration detection, the absorbance was measured at 214 nm and the UV extinction coefficient value was fixed at $1.27 \times 10^4 \text{ mL.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

The eluent used for AFIFFF-MALS analysis was a 2 mM sodium phosphate with 14 mM sodium chloride buffer, pH adjusted at 6.0 by addition of phosphoric acid (85.1 % v/v). The eluent was filtered before use (vacuum filtration system using Gelman filters of $0.1 \mu\text{m}$).

The AFIFFF fractionation procedure consisted in three steps: injection, focus, and elution. For separation, the channel flow rate was fixed at 1 mL.min^{-1} and the cross-flow rate varied. During injection, eluent entered the channel by inlet and outlet and was completely wasted by the cross-flow outlet. A first step consisted of fixing the cross-flow rate at 1.5 mL.min^{-1} . The flows and system pressure were then allowed 1 min to stabilize before sample injection into the channel. The sample volume injected was $30 \mu\text{l}$ at a flow rate of 0.2 mL.min^{-1} . After injection, 1 min of focus was kept before the elution started. In elution mode, the sample components were then eluted at 1.5 mL.min^{-1} during 6 min, and then the cross-flow rate decreased linearly during 7 min, followed by an elution at 0.2 mL.min^{-1} for 40 min. The flow-rate through the detectors, V_{out} , was constantly maintained at 1 mL.min^{-1} .

Calculations of molecular weight number-average (M_n), weight-average (M_w) and mass fraction were performed using the ASTRA software (version 5.3.4.14, Wyatt technology, Santa Barbara, US).

Results and discussion:

Fig.1A represents a chromatogram for a standard solution containing ϵ -DNP-Lysine with retention times of 9.5 min. Detector response was linear in the studied concentration range ($50\text{-}800 \text{ mg.l}^{-1}$). Determination correlation was 0.9987. Reproducibility of the retention time for ϵ -DNP-Lysine was assessed by five injections of sample. The coefficient of variation was less than 3 %. This confirms the good method reproducibility.

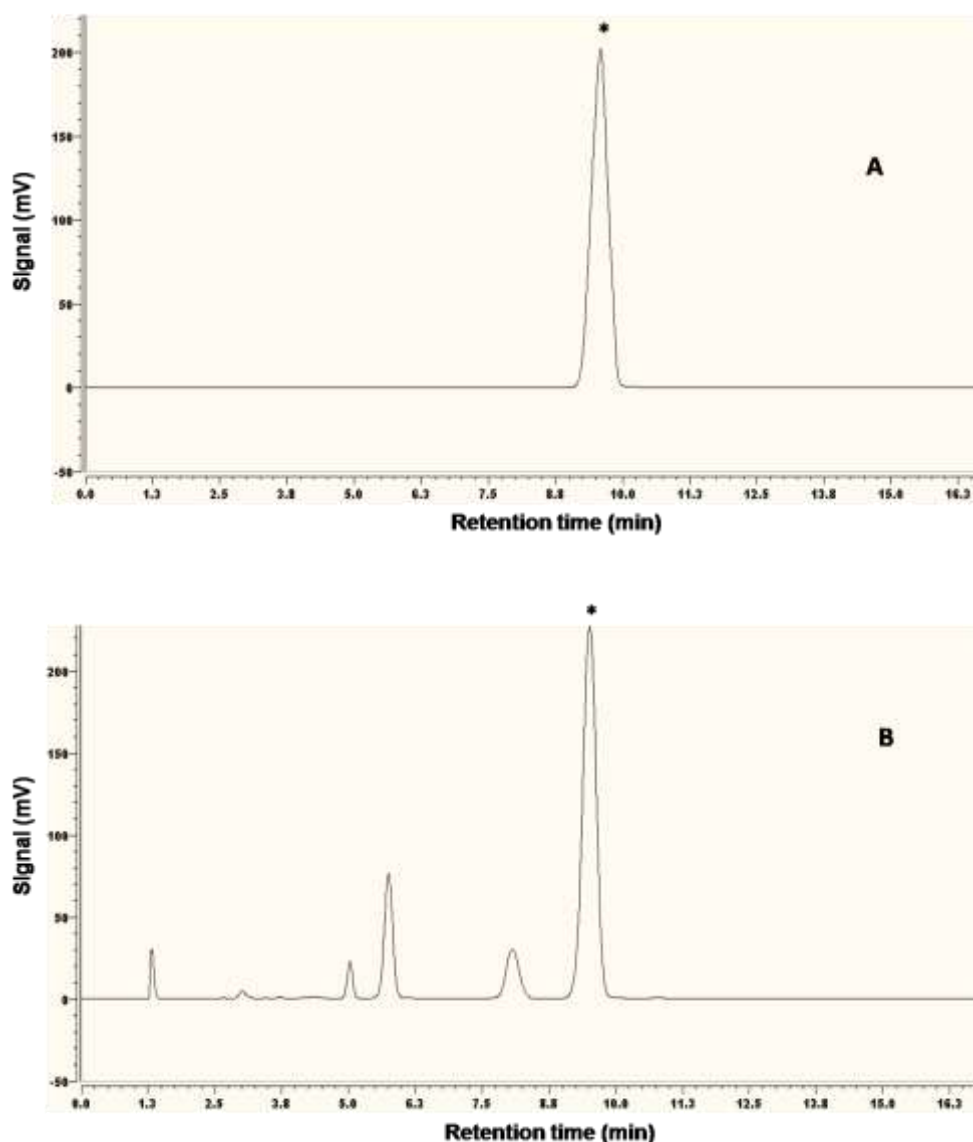


Figure 1. HPLC-UV chromatograms registered at 360 nm for (A) standard solution of ϵ -DNP-Lysine (200 μ g/ml) and (B) gelatin hydrolysate sample.

Figure 1B represents gelatin hydrolysate sample. The major peak was ϵ -DNP-Lysine. By-products low quantity is to be underlined. Diethylether cleaning completed before and after gelatin hydrolysis could explain this observation. These steps permitted to eliminate unreacted FDNB and other DNP-amino acids (Moughan and Rutherford, 1996 ; Ramírez-Jimenez et al , 2004 ; Rufián-Henares et al, 2006). This limited interferences risk evoked in previous works (Albalá-Hurtado et al, 1997 ; Fernandez-Artigas et al, 1999). Moreover, potential by-product like DNP-Arginine and

dinitrophenol have been injected and presented a significant different retention time (no showed) in studied conditions.

Five determinations of available lysine for untreated gelatin were performed. R.S.D (Residual Standard Deviation) value obtained was 3.35%. Therefore this value is satisfactory (Albalá-Hurtado et al, 1997). The rate of available lysine was 3.1 ± 0.1 g/100g in this untreated gelatin. This value was normally lower than total lysine determined at 3.6 g/100g. This value was in the same order as available lysine determined in cereal-based food product (Torbatinejad, Rutherford and Moughan, 2005) or infant milk (Albalá-Hurtado et al, 1997). Available lysine/total lysine ratio was about 86 % in untreated gelatin. This ratio was higher than the ratio calculated in cereal-based food product (Torbatinejad, Rutherford and Moughan, 2005).

Determination of available lysine has been carried out in 2, 6 and 8 days thermally treated gelatin. The results are presented in Fig.2. A significant decrease of available lysine is observed from 3.11 at 0 days to 2.26 g/100g of gelatin at 8 days of treatment. During this period, 27 % of available lysine disappeared. We found no reports on the consumption of available lysine in gelatin. However, studies on temperature and water activities (a_w) during storage of infant cereals indicated that the loss of available lysine can reach to 25 % after 1 week at 55°C ($a_w = 0.65$) (Ramírez-Jimenez et al, 2004).

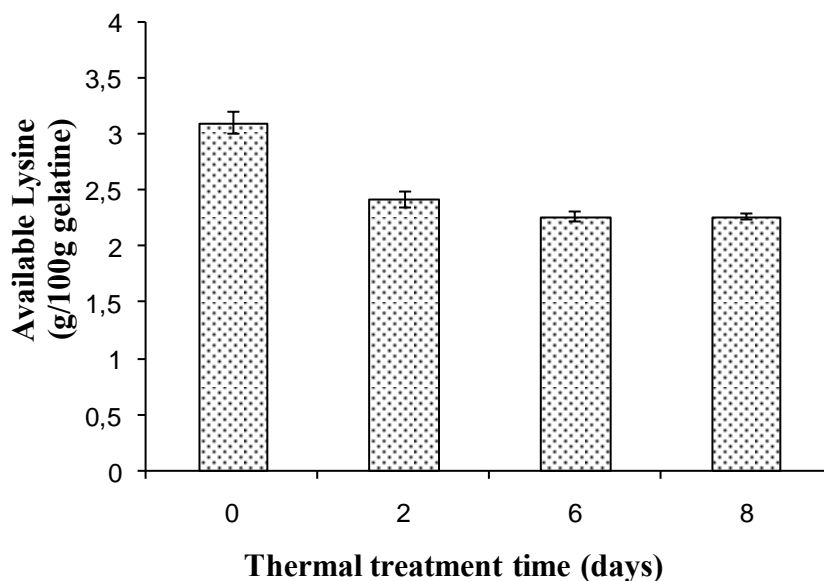


Figure 2. Effect of thermal treatment on available lysine in gelatin sample.

In the same time, as showed in figure 3, sample molar mass weight average (M_w) increases from $6.7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ to more than $2.0 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. The increase of M_w is well correlated with decrease of available lysine ($r^2 = 0.9893$).

Available lysine consumed during the thermal treatment of gelatin is involved in reactions that lead to formation of high molar mass compounds. This phenomenon has already been described in previous works (Rbii et al, 2009) that have clearly highlighted the formation of these high molar mass compounds. In a first time, these high molar mass compounds are soluble. If thermal treatment is extended more than 8 days, the size of these compounds continues to increase, making them insoluble in water. Observed phenomena could be explained as followed. Gelatin is the product of the partial hydrolysis of collagen. In acid or alkaline condition, the three α constitutive protein chains of the collagen triple helix are separated. Then gelatin is constituted mainly by α chains and a few β and γ chains, condensation products of 2 or 3 α chains. When a thermal treatment is applied on gelatin powder, lysine reacts with other constituents of its environment. The low humidity content in the powder and random coil conformation of α chains lead to a proximity of reactive functions. Reaction

between them is facilitated and lead to the formation of inter molecular links between gelatin chains (Yannas & Tobolsky ; 1967) or residual sugars through the Maillard reaction.

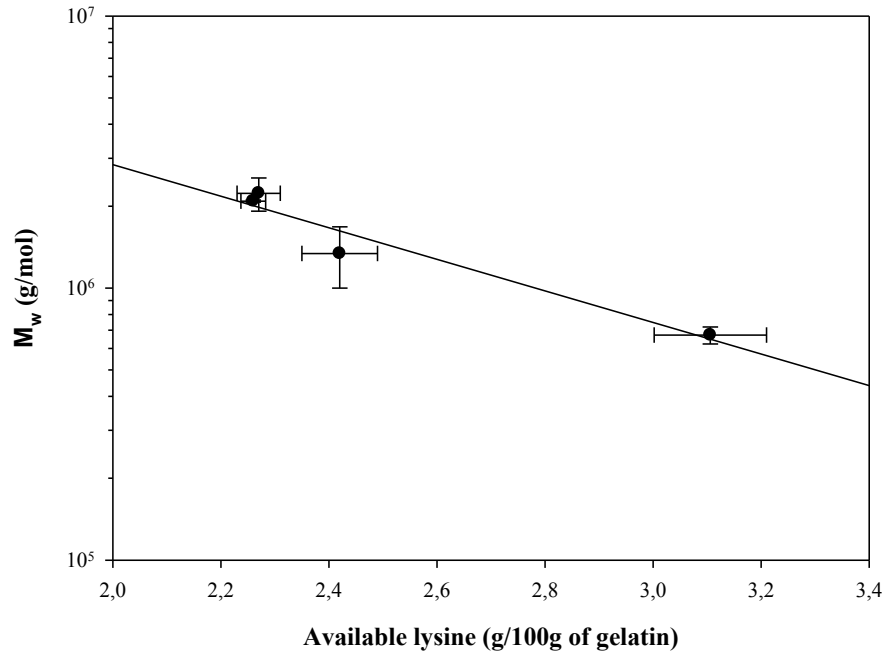


Figure 3. Available lysine vs sample Mw.

At last, as showed in figure 4, the ability of the gelatin sample to reform helixes decrease for thermally treated gelatin when available lysine decrease. Whereas for no thermally treated sample the helixes content rise to more than 0.40, this value is under 0.30 for thermally treated gelatin.

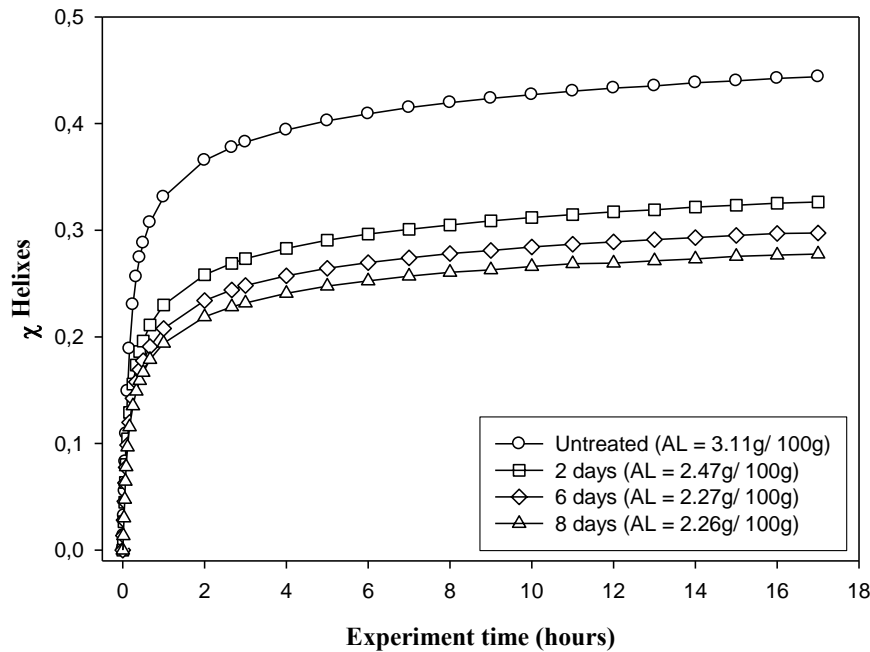


Figure 4. Helixes formation during incubation times for untreated and 2, 6 and 8 days thermally treated samples. The content of available lysine (AL) is precised in brackets

In solution at temperature higher than 40°C, α , β and γ chains are in random coil conformation (Bigi et al, 2004). When temperature decreases, the conformation transition from random coil to triple helixes is observed. A number of intra and inter molecular triple helixes conformation depend on gelatin concentration (Harrington et Rao, 1970 ; Djabourov et al, 1985) and can lead to gel formation. Indeed, as most available lysine rate decreases, less triple helixes formation occurred when gelatin is handed in solution. This could be explained by the involvement of lysine in intra-molecular links. These intra-molecular links limit α chains unfolding and therefore their reorganization. This phenomenon is in agreement with our previous works (Rbii, 2010). We had highlighted that the thermal treatment of gelatin strongly limited gelatin renaturation and maintain a high content of α chain.

Conclusion

Quantification of available lysine in gelatin by LC-UV has been developed. This method has been very important to evaluate implication of lysine function in cross-linking during gelatin thermal treatment. Available lysine implication in intra an intermolecular link has been showed. In fact, decrease of available lysine content during thermal treatment is well correlated with increase of sample Mw. In the same time, thermally treated gelatin has less ability to form helixes. Identification of cross-links nature and of other amino acid involved in cross-link will be performed.

Acknowledgements: the authors thank the Rousselot company and the French Ministry (ANRT) for financial support.

References

- Albalá-Hurtado, S., Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. & Vidal-Carou, M. C. (1997). Determination of available lysine in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778, 235-241.
- Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675-5680.
- Brown, J., Madit, N., Cole, E.T., Wilding, I.R., & Cadé, D. (1996). The effect of cross-linking on the in vivo desintegration of hard gelatin capsules. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1026-1030.
- Carpenter, K.J. (1960). The estimation of the Available Lysine in Animal-Protein foods. *Biochemistry Journal*, 77, 604-610.
- Carvalho, R.A., & Grosso, C.R.F. (2006). Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 45-53.
- Chafetz, L., Hong, W.H., Tsilifonis, D.C., Taylor, A.K., & Philip, J. (1984) Decrease in the rate of capsule dissolution due to formaldehyde from polysorbate-80 autoxidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73(8), 1186-1187.
- Digenis, G.A.; Gold, T.B. & Shah, V.P. (1994) Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in-vitro in-vivo performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(7), 915-921.
- Djabourov, M. Maquet, J. Theveneau, H., Leblond, J., & Papon, P. (1985). Kinetics of gelation of aqueous gelatin solutions. *British Polymer Journal*, 17 (2), 169-174.

- Fernandez-Artigas, P., García-Villanova, B. & Guerra-Hernández, E. (1999). Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 851-854.
- Harrington, W.F., & Rao, N.V. (1970). Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9 (19), 3714–3724.
- Hopkins, D.T. (1981) Effects of variation in protein digestibility. In *Protein quality in humans: assessment and in vitro estimation*. Bodwell, C.E., Adkins, J.S., Hopkins, D.T., Eds ; AVI Publishing Westport, Connecticut, 1981, 169-193.
- Hurrell, R.F. & Carpenter, K.J. (1981) The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 159-176.
- Marks, E.M. Tourtellotte, D. Andux, A. (1968). The phenomenon of gelatin insolubility. *Food Technology*, 22, 1433-1436.
- Meyer, M.C., Straughn, A.B., Mhatre, R.M., Hussain, A., Shah, V.P., Bottom, C.B., Cole, E.T., Lesko, L.L., Mallinowski, H., & Williams, R.L. (2000). The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules. *Pharmaceutical Research*, 17 (8), 962-966.
- Moughan, P.J. & Rutherfurd, S.M (1996). A new method for determining digestible reactive lysine in foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 2202-2209.
- Ofner, C.M., Zhang, Y., Jobeck, V.C., & Bowman, B.J. (2001). Crosslinking studies in gelatin capsules treated with formaldehyde and in capsules exposed to elevated temperature and humidity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 79-88.
- Rabasseda, J., Rauret, G., & Galceran, M.T. (1988) Liquid-chromatographic determination of available lysine in soybean and fish-meal. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71(2), 350-353.

- Ramírez-Jimenez, A., García-Villanova, B. & Guerra-Hernández, E. (2004). Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chemistry*, 85, 239-244.
- Rbii, K., Violleau, F., Guedj, S., & Surel, O. (2009). Analysis of aged gelatin by AFIFFF-MALS: Identification of high molar mass components and their influence on solubility. *Food Hydrocolloids*, 23, 1024-1030.
- Rbii, K., Surel, O., Brambati, N., Buchert, A.-M. & Violleau, F. (2010). Study of gelatin renaturation in aqueous solution by AFIFFF-MALS: influence of a thermal pre-treatment applied on dry gelatine. *Submitted for publication in Food Hydrocolloids*.
- Rufián-Henares, J.A., Guerra-Hernández, E. & García-Villanova, B. (2006). Available lysine and fluorescence in heated milk proteins/dextrinomaltose or lactose solutions. *Food Chemistry*, 98, 685-692.
- Torbatinejad, N.M., Rutherford, S.M., & Moughan, P.J. (2005). Total and reactive lysine contents in selected cereal-based food products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 4454-4458.
- Yannas, I. V., & Tobolsky, A. V. (1967). Cross-linking of gelatin by dehydration. *Nature (London)* 215, 509-510.

IV. Bilan de cette étude

La mise en place d'une méthode de quantification de la lysine disponible a permis de quantifier celle-ci au cours du vieillissement. Les résultats obtenus montrent bien une diminution du taux de lysine disponible au cours du vieillissement, avec un pourcentage de lysine disponible qui passe de 3.11 g/100 g de protéine à T_0 , à 2.26 g/100 g de protéine au 8^{ème} jour de vieillissement. Cette diminution de taux de lysine est directement corrélée à l'augmentation de la masse moléculaire M_w au cours du vieillissement.

Cette étude a permis de conforter l'idée que le traitement thermique induit la formation de réticulation naturelle, notamment par l'intermédiaire de la lysine.

Ayant confirmé l'implication de la lysine dans ce phénomène, il serait intéressant de compléter ces résultats par des analyses d' HPLC-MS, afin de déterminer la nature des liens chimiques, ainsi que les autres acides aminés impliqués dans la réticulation.

*Chapitre VI. Application des résultats à la prédiction de la
solubilité*

I. Introduction

Une des priorités des fabricants de gélatine est de contrôler la qualité de leurs produits, notamment ceux destinés au secteur pharmaceutique. Il est important de fournir des lots de gélatine de qualité constante, stable dans les conditions de stockage. Comme précisé dans le **Chapitre III**, des études ont montré que dans certaines conditions, spécialement lorsque la gélatine est soumise à des températures élevées et à une humidité importante, la gélatine s'insolubilise (Meyer *et al.*, 2000).

Nous avons montré à travers ces travaux de recherche, la pertinence de l'utilisation d'un outil analytique tel que l'AFIFFF-MALS, notamment dans la compréhension de l'insolubilité observé au cours d'un vieillissement accéléré. La mise en évidence de la forte polydispersité que l'on peut observer au sein d'un échantillon de gélatine, notamment la présence de particules de très hauts poids moléculaires (P_1 , P_2), qui ne peuvent être déterminées par les méthodes classiques d'exclusion stérique (SEC), pourrait expliquer le manque de solubilité. La SEC est la méthode traditionnellement utilisée en industrie pour contrôler la qualité de la gélatine. Or cette méthode ne permet pas de mettre en évidence la présence des particules de hauts poids moléculaires qui jouent un rôle important dans la perte de solubilité de la gélatine comme démontré dans cette étude.

Outre les tests classiques (Viscosité, Bloom, etc.) utilisés pour déterminer la qualité du produit final, il serait intéressant d'étudier la pertinence des paramètres obtenus grâce à l'AFIFFF-MALS, ainsi que le taux de lysine disponible qui joue un rôle prédominant dans les mécanismes conduisant à la perte de solubilité (cf. chapitre V), pour prédire la solubilité de la gélatine.

Pour cela un ensemble d'analyses statistiques a été réalisé pour prédire le comportement de la gélatine en solution.

II. Matériels et méthodes

L'étude a été réalisée sur une série de 17 échantillons provenant de différents sites de production de la société Rousselot. Pour un souci de confidentialité, les échantillons, ainsi que les sites de production seront codés.

Chaque échantillon fourni par la société Rousselot a fait l'objet d'un certain nombre d'analyses de routine pour le contrôle de la qualité.

A. **Données Rousselot**

➤ La viscosité

Elle est mesurée en déterminant le temps d'écoulement de 100 ml d'une solution à 6.67% de gélatine dans l'eau à 60°C avec une pipette viscosimétrique spéciale dont l'orifice est calibré. Plus la solution est visqueuse, plus cette durée d'écoulement est longue. Une table d'étalonnage permet ensuite de convertir ce temps en mesure de viscosité exprimé en mPa.s.

La société Rousselot détermine également la viscosité d'une solution de gélatine à 30% pour répondre à des problématiques industrielles.

➤ Test classique de dissolution

La société Rousselot a mis en place un test de dissolution au sein de son laboratoire de recherche, afin de répondre aux exigences de plus en plus contraignantes des industriels du secteur pharmaceutique. Le test de solubilité est effectué sur des échantillons de gélatine en film.

L'appareil utilisé est un appareil à palettes tournantes, relié à un spectrophotomètre. Il est constitué de 6 réacteurs contenant le milieu de dissolution maintenu en agitation par une palette en rotation. C'est dans ces réacteurs qu'est introduit le film de gélatine à tester, après avoir été préalablement lesté à l'aide d'une spirale en acier inoxydable. Les réacteurs baignent dans un bain maintenu à température constante. Le film de gélatine lesté est mis à fondre dans les réacteurs à 37°C, sous agitation, pendant exactement 16 minutes. La solubilité est ensuite déterminée de manière indirecte par spectrophotométrie, en mesurant l'absorbance à 218 nm (4 ou 5 fois par échantillon) au cours de la solubilisation.

Une gélatine est dite « **bonne** » en dissolution si au moins 50% du film est solubilisé avant la 9^{ème} minute d'analyse. Une gélatine est dite « **mauvaise** » en dissolution, si moins de 50% du film est solubilisé avant la 9^{ème} minute d'analyse.

➤ Echantillons

Le *Tableau 6* recense les différents échantillons Rousselot utilisés pour l'analyse statistique, avec les différentes données obtenues par la société Rousselot.

Tableau 6: Caractéristiques des échantillons Rousselot

| Références | Site | Extraction | Test Dissolution | Viscosité 6,67% | Viscosité 30% |
|------------|------|------------|------------------|-----------------|---------------|
| 1 | 1 | acide | Mauvais | 4,57 | 963 |
| 2 | 1 | - | Mauvais | 4,48 | 807 |
| 3 | 1 | - | Mauvais | 4,46 | 783 |
| 4 | 1 | - | Bon | 4,49 | 800 |
| 5 | 1 | - | Bon | 4,40 | 830 |
| 6 | 2 | acide | Bon | 4,59 | 918 |
| 7 | 2 | - | Bon | 4,29 | 762 |
| 8 | 2 | - | Bon | 4,30 | 755 |
| 9 | 3 | acide | Mauvais | 4,33 | 836 |
| 10 | 3 | - | Mauvais | 4,45 | 877 |
| 11 | 3 | - | Moyen | 4,32 | 874 |
| 12 | 3 | - | Bon | 4,40 | 823 |
| 13 | 4 | basique | Bon | 4,63 | 705 |
| 14 | 4 | - | Bon | 4,59 | 756 |
| 15 | 4 | - | Moyen | 4,71 | 732 |
| 16 | 4 | - | Mauvais | 4,54 | 739 |
| 17 | 4 | - | Mauvais | 4,57 | 813 |

B. Données AFIFFF-MALS

Outre la détermination du M_n , M_w et I_p par AFIFFF-MALS, d'autres paramètres peuvent être obtenus grâce à cette technique, notamment :

➤ Masse molaire moyenne en z (M_z) :

Elle est définie par l'équation suivante :

$$M_z = \frac{\sum C_i M_i^2}{\sum C_i M_i} \quad (13)$$

➤ Rayon de giration (R_g)

Le rayon de giration moyen en nombre :

Le rayon de giration moyen en masse :

$$\langle R_g \rangle_n = \frac{\sum \left(\frac{C_i}{M_i} \langle r_g^2 \rangle_i^{0,5} \right)}{\sum \frac{C_i}{M_i}} \quad (14)$$

$$\langle R_g \rangle_w = \frac{\sum \left(C_i \langle r_g^2 \rangle_i^{0,5} \right)}{\sum C_i} \quad (15)$$

Où M_i est la masse moléculaire de l' $i^{\text{ème}}$ atome, de concentration c_i et R_i la distance au centre de masse de la $i^{\text{ème}}$ macromolécule.

➤ Le rayon hydrodynamique :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (16)$$

Avec k_B la constante de Boltzmann, η la viscosité du milieu, T la température et D le coefficient de diffusion.

➤ Taux de recouvrement :

Le taux de recouvrement est le rapport entre la quantité injectée et la quantité détectée. Le taux de recouvrement dépend notamment du seuil de coupure de la membrane utilisée en AFIFFF. Dans le cas de l'analyse de la gélatine, la membrane généralement utilisée est une membrane de 5 kDa. Toutes les fractions protéiques inférieures à 5 kDa passent donc à travers la membrane, sans être analysées, induisant ainsi une diminution du taux de recouvrement.

De plus, la segmentation d'un fractogramme en fonction des différentes espèces présente dans l'échantillon (*Figure 33*), permet de s'enrichir de données supplémentaires (M_w (α, β, γ) ; M_w (P_1, P_2) ; I_p (α, β, γ) ; % recouvrement (P_1, P_2) ; etc).

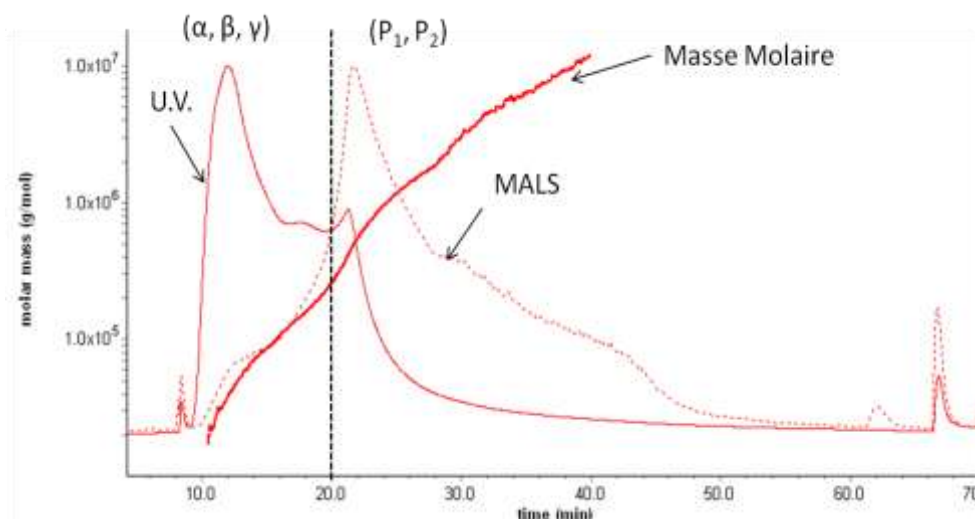


Figure 33: Exemple de segmentation de fractogramme

C. Détermination du taux de lysine

On a observé qu'au cours du vieillissement accéléré, le taux de lysine disponible diminuait du fait de l'apparition d'agrégats de hauts poids moléculaires. Cette variation du taux de lysine disponible au cours du vieillissement, montre l'implication de celle-ci dans l'apparition de l'insolubilité. Nous avons donc pour chaque échantillon, déterminé le pourcentage de lysine disponible à T_0 (cf. Chapitre V).

Ci-dessous un tableau récapitulatif de l'ensemble des données utilisées pour les analyses statistiques (*Tableau 7*)

Tableau 7: Tableau récapitulatif des données utilisées en statistique

| Données AFIFFF-MALS | | | Donnée HPLC | Données Rousselot |
|--|--|--|--|-------------------------|
| Ip1 (Mw/Mn) Ip2 (Mz/Mn) Mn Mw Mz Rg _n , Rg _w , Rg _z Rh _n , Rg _w , Rg _z Taux de recouvrement | Ip1(α,β,γ) Ip2(α,β,γ) Mn (α,β,γ) Mw (α,β,γ) Rg (α,β,γ) Rh (α,β,γ) Taux de recouvrement (α,β,γ) | Ip1(P ₁ ,P ₂) Ip2(P ₁ ,P ₂) Mn ((P ₁ ,P ₂) Mw (P ₁ ,P ₂) Rg (P ₁ ,P ₂) Rh ((P ₁ ,P ₂) Taux de recouvrement (P ₁ ,P ₂) | Taux de lysine disponible à T ₀ | Viscosité (6.67 et 30%) |

III. Analyses AF4FFF-MALS suivant le procédé d'extraction

Suivant le procédé d'extraction (acide ou chaulé) utilisé par les différents sites de production, on observe des fractogrammes différents.

➤ Procédé Acide

Les échantillons issus du procédé d'extraction **acide** présentent des profils UV très similaires (Figure 34).

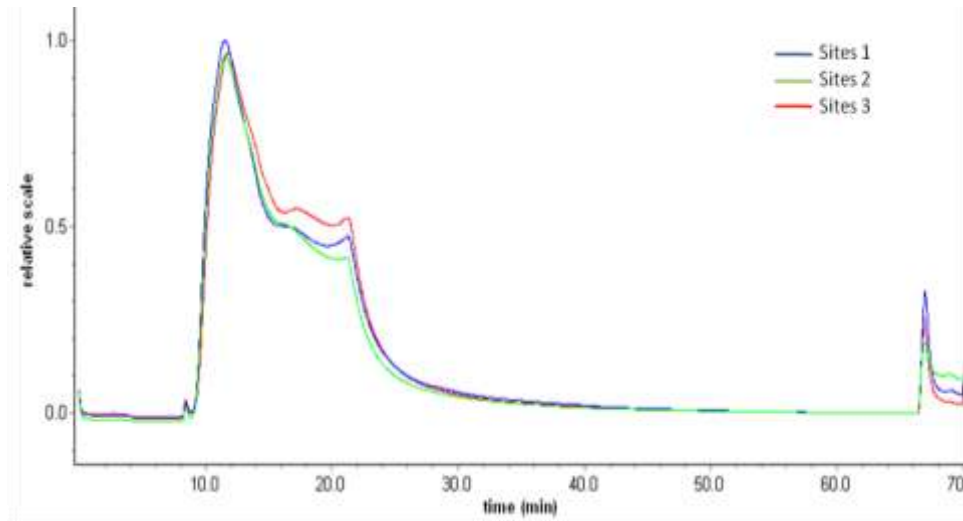


Figure 34: Profils U.V. des gélatines issues d'un traitement acide

➤ Procédé Basique

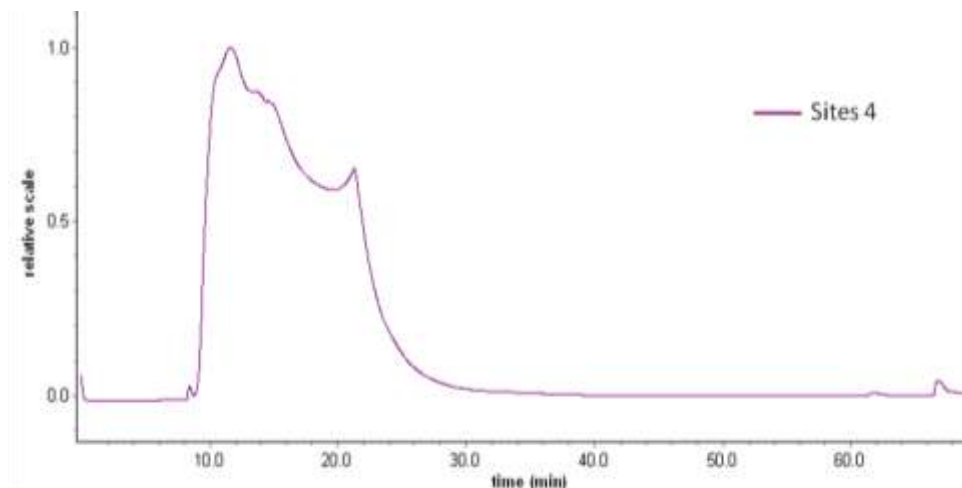


Figure 35: Fractogramme gélatines issues traitement chaulé

Une signature UV différente pour les échantillons issus d'un procédé d'extraction basique, comme on peut le voir sur la *Figure 35*, avec une fraction protéique (α, β, γ), plus importante en quantité dans les gélatines issus d'un procédé basique.

IV. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites par ACP (Analyse en Composante Principal) et AFD (Analyse factorielle Discriminante) avec le logiciel Xlsats (Addinsoft, France).

A. Discrimination des échantillons selon leur vitesse de dissolution

L'objectif de cette étude est de montrer si, à partir des données AFIFFF-MALS, nous pouvons discriminer les échantillons bons, moyens et mauvais en dissolution.

La première analyse statistique a consisté à faire une ACP sur les données AFIFFF-MALS, afin de présenter, sous une forme graphique, le maximum de l'information (*Figure 36*). Cette analyse permet de voir comment se structurent nos variables, notamment celles qui sont corrélées entre-elles, celles qui ne le sont pas, ainsi que celles qui vont dans le même sens et celles qui s'opposent.

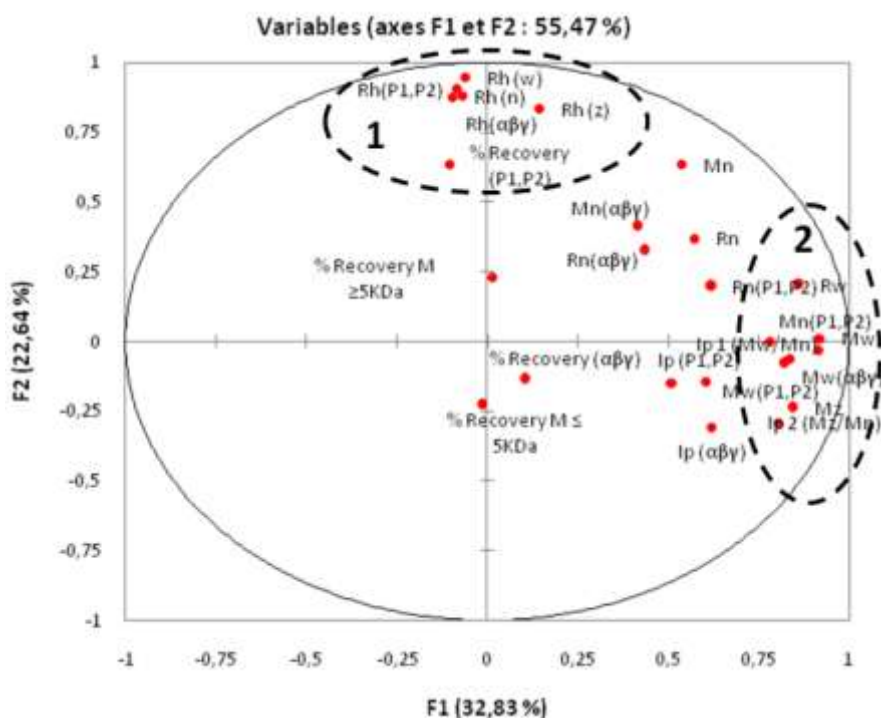


Figure 36 : Corrélation données AFIFFF-MALS par ACP

Comme on peut le voir sur la *Figure 36*, le pourcentage d'explication de la variabilité sur 2 axes reste relativement faible (55.47 %). On observe néanmoins deux groupes distincts de variables, le groupe 1 qui est dépendant du rayon hydrodynamique (R_h) et le groupe 2 dépendant de la masse moléculaire (M_w). Ceci se confirme dans le *Tableau 8*, si l'on regarde la contribution de chaque variable sur l'axe F1 et F2, on constate alors que les contributions sur l'axe F1 sont majoritairement liées au M_w et sur l'axe F2 au R_h .

Tableau 8: Contribution des variables (%) à la constitution des axes

| | F1 | F2 |
|--|--------|--------|
| % Recovery $M \leq 5\text{KDa}$ | 0,064 | 1,408 |
| % Recovery $M \geq 5\text{KDa}$ | 0,064 | 1,408 |
| Ip 1 (M_w/M_n) | 10,097 | 0,054 |
| Ip 2 (M_z/M_n) | 7,628 | 1,661 |
| M_n | 3,771 | 6,503 |
| M_w | 10,360 | 0,002 |
| M_z | 8,494 | 1,161 |
| R_n | 3,928 | 1,970 |
| R_w | 9,092 | 0,535 |
| R_z | 8,172 | 0,149 |
| R_h (n) | 0,026 | 13,693 |
| R_h (w) | 0,015 | 15,758 |
| R_h (z) | 0,483 | 12,197 |
| Ip ($\alpha\beta\gamma$) (M_w/M_n) | 4,374 | 2,043 |
| $M_n(\alpha\beta\gamma)$ | 2,136 | 2,573 |
| $M_w(\alpha\beta\gamma)$ | 8,325 | 0,158 |
| $R_n(\alpha\beta\gamma)$ | 2,354 | 1,604 |
| $R_h(\alpha\beta\gamma)$ | 0,065 | 13,698 |
| % Recovery ($\alpha\beta\gamma$) | 0,257 | 0,140 |
| Ip (P1,P2)(M_w/M_n) | 3,482 | 0,146 |
| $M_n(P1,P2)$ | 7,483 | 0,012 |
| $M_w(P1,P2)$ | 4,563 | 0,390 |
| $R_n(P1,P2)$ | 4,685 | 0,490 |
| $R_h(P1,P2)$ | 0,057 | 14,186 |
| % Recovery (P1,P2) | 0,028 | 8,062 |

Cette analyse permet ainsi de réduire l'information en un nombre de composantes plus limité que le nombre initial de variables, sélectionnant les plus pertinentes d'entre-elles, afin d'alléger le nombre de mesures sur dans nos prochaines études.

The figure consists of two vertically stacked PCA plots. The top plot, titled 'Observations (axes F1 et F2 : 100,00 %)', shows the distribution of three observation categories: 'Bon' (blue dots), 'Mauvais' (green dots), and 'Moyen' (red dots). The 'Mauvais' category is clustered in the upper-left quadrant (negative F1, positive F2), while 'Bon' and 'Moyen' are more centrally located. The bottom plot, titled 'Variables (axes F1 et F2 : 100,00 %)', shows the distribution of various variables. A large ellipse encloses the main cluster of variables. Variables like 'Rh(αβγ)', 'Rh(αβγ, n)', 'Rh(αβγ, P2)', 'Rh(αβγ, P1, P2)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43)', 'Rh(αβγ, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25, P26, P27, P28, P29, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P41, P42, P43,

127

Les résultats montrent que la discrimination des échantillons grâce à l'AFIFFF-MALS est possible mais qu'il existe des zones de recouvrement entre les échantillons bons et mauvais en dissolution. La séparation grâce à l'AFIFFF est donc imparfaite.

Si l'on rajoute aux données quantitatives AFIFFF-MALS, le pourcentage de lysine disponible, ainsi que les variables quantitatives principalement utilisées par les producteurs de gélatine, pour expliquer la qualité de celle-ci, telles que la viscosité à 6.67% et 30%, on obtient alors la répartition suivante (Figure 38) :

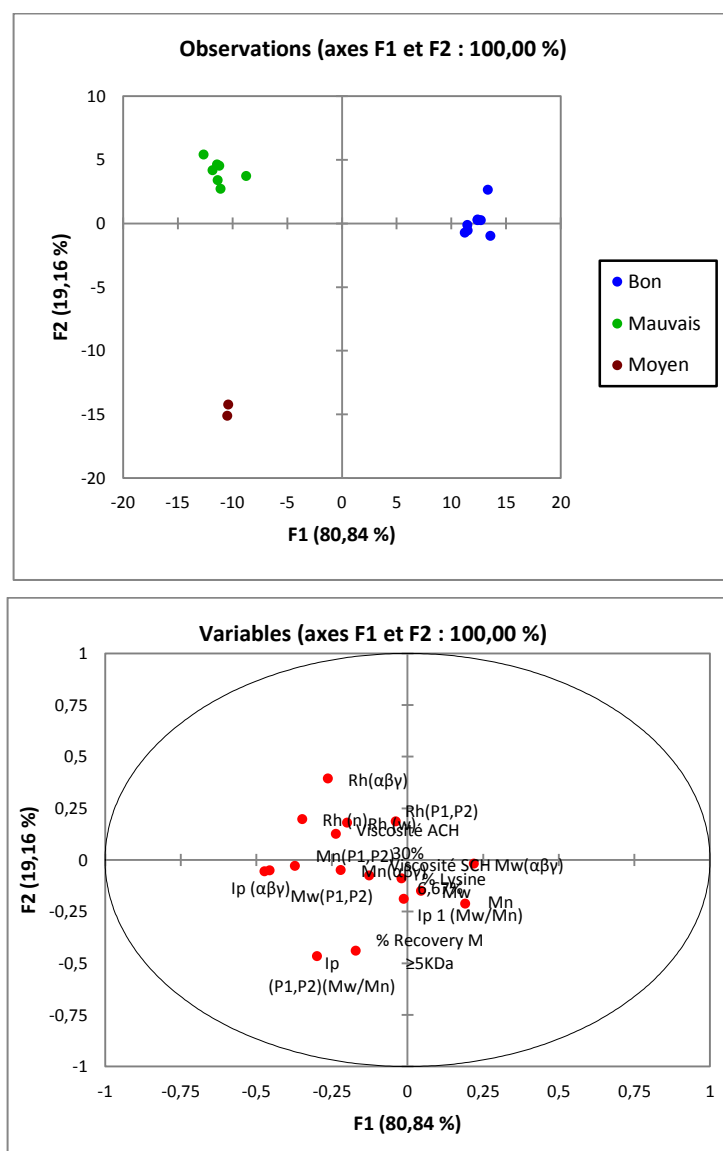


Figure 38: Discrimination des échantillons en fonction des données AFIFFF-MALS, la viscosité et le taux de lysine

On observe alors une meilleure discrimination, l'ajout de ces 3 variables permettant de mieux classer les échantillons en fonction de leurs qualités en dissolution.

B. Discrimination des échantillons en fonction du site de production

Suite aux résultats observés précédemment, il était intéressant de voir si les variables quantitatives obtenus par AFIFFF-MALS, permettent de classer les échantillons en fonction des sites de production (*Figure 39*).

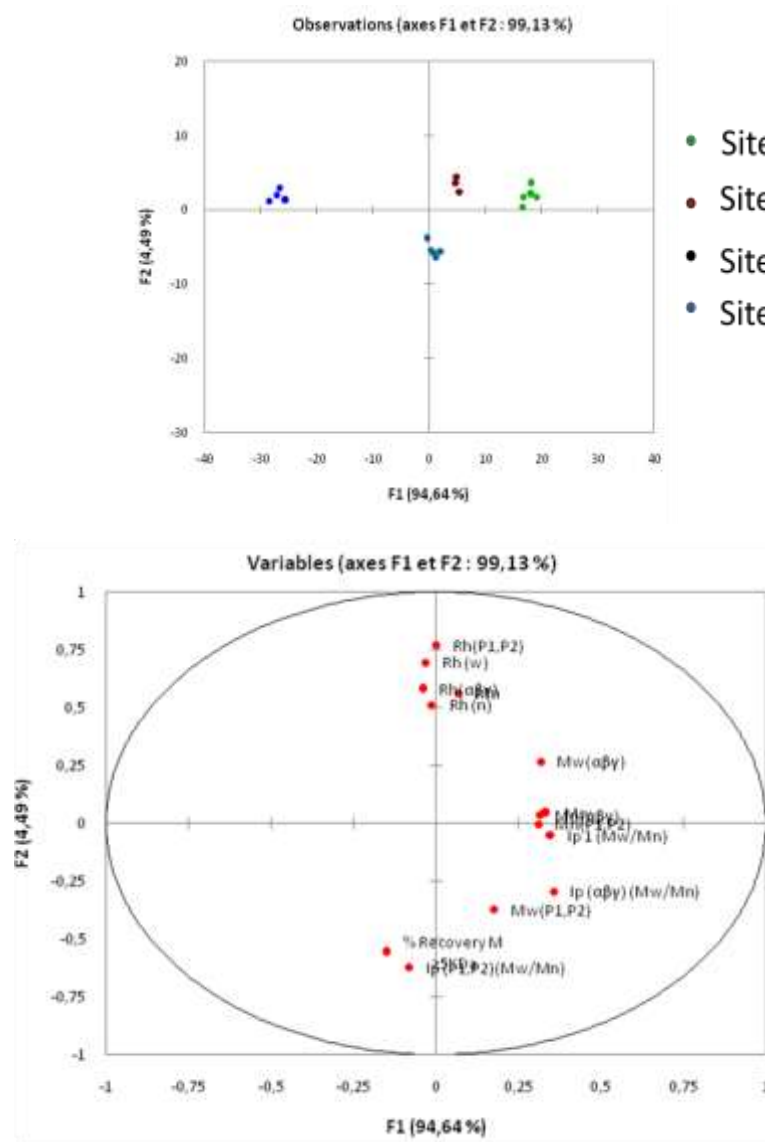


Figure 39: Classement des échantillons en fonction du site de production (Données AFIFFF-MALS)

On constate qu'une AFD à partir des données AFIFFF-MALS permet de classer les groupes d'individu en fonction du site de production. Comme on peut le voir sur la *Figure 39*, les échantillons issus d'un procédé d'extraction acide se situent au dessus de l'axe F1 et les échantillons issus du procédé chaulé en dessous de l'axe F1.

La discrimination des échantillons issus de procédés acides est principalement due à des critères de masse moléculaire, alors que les échantillons issus d'un procédé chaulé se

différencient par les critères tels que le rayon hydrodynamique (R_h), le taux de recouvrement et l'indice de polydispersité.

Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés sur les *Figure 34* et *Figure 35* qui montrent une signature UV différente selon le procédé d'extraction.

L'ajout des paramètres comme la viscosité et le taux de lysine (*Figure 40*), n'induit pas une meilleure discrimination. On observe toujours une classification en fonction du site de production, avec cette fois-ci les gélatines issues du procédé acide en dessous de l'axe F1 et les gélatines issus du procédé chaulé au-dessus de l'axe F1. Ceci s'explique surtout par des différences de viscosité, le taux de lysine libre contribuant peu à l'explication de la variabilité.

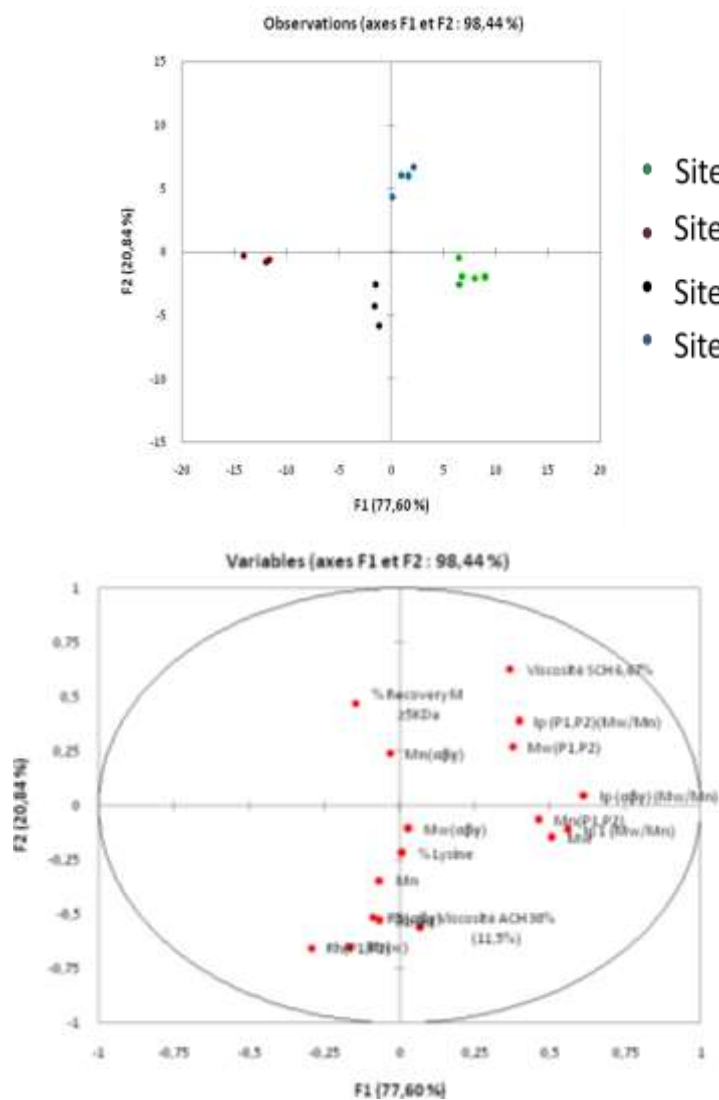


Figure 40: Classement des échantillons en fonction du site de production (Données AFIFFF-MALS, Viscosités et taux de lysine libre)

V. Conclusion

Cette étude montre que les paramètres AFIFFF-MALS, ajoutés à un paramètre classique comme la viscosité ou à un nouveau paramètre comme le taux de lysine libre, permettent de classer les échantillons en fonction de leur qualité en dissolution. En revanche, le classement des échantillons en fonction du site de production peut être réalisé par les profils de masses et les viscosités, mais pas grâce à la lysine disponible. Ce dernier résultat souligne bien le fait que la lysine disponible est influencée par le vieillissement et non par le process.

On pourrait supposer qu'une analyse statistique avec plus d'échantillons, permettrait de mettre en place une « **équation de prédiction** » du comportement de la gélatine en solution, permettant ainsi aux fabricants de gélatine, de fournir des lots de qualité constante, notamment ceux à destination pharmaceutique.

Conclusion Générale

Nous nous sommes attachés, dans cette étude, à répondre à une problématique récurrente chez les fabricants de gélatine, l'apparition du phénomène d'insolubilité observé pour la gélatine en solution aqueuse.

La revue bibliographique de la première partie de ce manuscrit a mis en évidence que cette perte de solubilité était souvent observée lors de stockage à température élevée et humidité importante. Il a souvent été admis que cette perte de solubilité était due à la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires induite par des réticulations et/ou des liaisons hydrogènes, sans pour autant avoir été montré catégoriquement. Concernant le mécanisme chimique à l'origine de cette insolubilité aucune réponse réelle n'a été apportée, mais le rôle de la lysine a souvent été évoqué.

La gélatine est connue pour être un mélange hétérogène de polypeptides et de protéines, avec une masse moléculaire comprise entre 100 000 et plus d'un million g.mol^{-1} (Stainsby ; 1977). L'estimation de la masse moléculaire dans les solutions de gélatine a souvent été réalisée par « Chromatographie d'Exclusion Stérique » (SEC).

La première étape a consisté à déterminer la masse moléculaire de la gélatine en solution, à partir d'une technique analytique peu répandue qu'est le fractionnement par Flux-Force couplée à une diffusion de la lumière Multiangulaire (AFIFFF-MALS). Cette technique a permis de déterminer une masse moléculaire comprise entre 3.10^4 et $1.10^7 \text{ g.mol}^{-1}$, traduisant bien l'hétérogénéité que l'on peut observer au sein d'une solution de gélatine. Outre la détermination des différentes fractions (α , β , γ) présentes dans les solutions de gélatine, cette technique a permis d'identifier des fractions (P_1 , P_2) de très hauts poids moléculaires qui ne peuvent être observées par les techniques classiques d'exclusion stérique (SEC).

La seconde phase de notre étude a été consacrée à la compréhension de l'insolubilité dans les solutions de gélatine. Cette perte de solubilité est associée à une polymérisation et/ou agrégation des chaînes, induisant une augmentation de la masse moléculaire. La mise en place d'un test de vieillissement accéléré à 75°C pour recréer l'insolubilité de la gélatine a permis de confirmer l'évolution de la masse moléculaire par AFIFFF-MALS.

Cette technique a montré, une forte augmentation de la masse moléculaire de la gélatine au cours du vieillissement accéléré, aboutissant à l'insolubilité de celle-ci.

Durant la première partie du vieillissement (0 au 4^{ème} jour), l'évolution de la masse moléculaire (M_w) de $9,5$ à $30,2 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ est principalement due à l'augmentation en quantité des particules P_2 . A partir du 8^{ème} jour et jusqu'au 30^{ème} jour de vieillissement, l'insolubilité de la gélatine apparaît, le M_w décroît alors de $27,8$ à $15,9 \cdot 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. En effet lorsque la taille des particules et/ou la densité ne permettent plus la solubilisation, elles disparaissent alors de la fraction soluble analysable par AFIFFF-MALS, ce qui explique la diminution de la masse moléculaire, au cours de la deuxième partie du vieillissement (8^{ème} au 30^{ème} jour). Cette étude a donc mis en évidence que l'insolubilité dans la gélatine était principalement due à la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires.

Mais il est établi que la gélatine se réorganise en solution pour reformer la structure du collagène quand la température est inférieure à 35°C , de même que cette renaturation est le résultat d'un processus d'agrégation des chaînes protéiques. Au vu de cela, il était important de déterminer si l'insolubilité observée au cours du vieillissement était simplement due à une renaturation de la gélatine en solution.

Une cinétique de renaturation de la gélatine suivie par AFIFFF-MALS a montré la réorganisation de celle-ci en solution aqueuse. Cette réorganisation de la gélatine durant la renaturation présente des profils AFIFFF-MALS différent de ceux obtenus au cours du vieillissement. En effet durant la renaturation on observe une forte diminution des fractions protéiques (α, β, γ), ce que l'on n'observe pas au cours du vieillissement, avec en parallèle de cela une forte augmentation des fractions P_1 et P_2 . Or durant le vieillissement, le seul phénomène réellement observé est la présence d'une population P_2 plus importante. Ceci montre donc que les deux phénomènes ne sont pas liés. On suppose que la diminution des fractions (α, β, γ) observée par AFIFFF-MALS au cours de la renaturation, est due à une réorganisation de ces chaînes qui vont s'agréger pour former des particules/agrégats de hauts poids moléculaires (P_1, P_2).

De plus, il a été observé que la renaturation d'une gélatine préalablement traitée thermiquement pendant 2 jours à 75°C , présente une incapacité partielle à se réorganiser en triple hélice, comme si la renaturation était bloquée. Le traitement thermique appliqué durant le vieillissement induit certainement un changement de conformation des chaînes les empêchant de se réorganiser dans l'eau ou d'évoluer au cours du temps.

Au cours du vieillissement, la gélatine subit un traitement thermique, aboutissant à l'apparition d'agrégats insolubles. Le traitement thermique induit un fort brunissement

associé à une forte odeur. Une des réactions à l'origine du brunissement et responsable notamment d'odeurs est « la réaction de Maillard ». Cette réaction a souvent lieu en présence de lysine. Un dosage, par HPLC, de la lysine disponible au cours du vieillissement a montré une diminution du taux de lysine, ce qui montre bien l'implication de celle-ci dans la formation des agrégats de hauts moléculaires à l'origine de l'insolubilité.

Cette étude suggère donc que l'insolubilité observée au cours du temps est due à un phénomène d'agréation induit par des réticulations naturelles impliquant la lysine.

Enfin une dernière étude sur la pertinence d'utiliser les données AFIFFF-MALS, ainsi que le taux de lysine comme paramètres de prédiction de la qualité de la gélatine lors de tests de dissolution, a été réalisée. Cette étude a montré, qu'outre l'utilisation de paramètres classiques de prédiction de la qualité (Viscosité, Bloom, etc.), les paramètres AFIFFF-MALS, permettent de discriminer les échantillons susceptibles d'être bon, moyen ou mauvais en dissolution.

En résumé, d'un point de vue scientifique, cette étude a démontré que l'insolubilité observée notamment au cours d'un traitement thermique, est corrélée à la masse moléculaire de la gélatine. Cette évolution de la masse moléculaire, induit la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires par formation de réticulations naturelles impliquant la lysine. Une des perspectives envisageables aujourd'hui pour compléter cette étude serait de compléter ces résultats par des analyses d' HPLC-MS, afin de déterminer la nature des liens chimiques (Maillard, liaisons amides, etc.), ainsi que tous les acides aminés susceptibles d'être impliqués dans les réticulations.

D'un point de vue industriel, l'utilisation d'une technique comme l'AFIFFF-MALS, serait un outil complémentaire dans la prédiction de la qualité de la gélatine. De plus la mise en place d'une analyse statistique à partir des données AFIFFF-MALS, sur un panel plus important d'échantillons permettrait de mettre en place une équation de prédiction du comportement de la gélatine en solution.

Annexes

La polarimétrie

A. Principe de la mesure

La polarimétrie est une technique spectroscopique fondée sur le principe suivant : l'interaction de la lumière polarisée monochromatique avec les électrons de valence des atomes d'une substance dépend de la répartition spatiale des atomes et de la longueur d'onde (Jirgensons, 1969). L'activité optique a son origine dans l'asymétrie du milieu réfractant : elle provient soit de la présence de carbones asymétriques (C*), soit de l'asymétrie de la chaîne elle-même.

Cette propriété se traduit au niveau macroscopique par la rotation du plan de polarisation de la lumière incidente. Si l'on appelle α l'angle de rotation du plan de polarisation, le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{\lambda}$, défini par :

$$[\alpha]_{\lambda,T} = \frac{\alpha}{cd}$$

où d est la longueur du chemin optique (dm), c est la concentration de la solution (g.cm^{-3}), α l'angle de rotation mesuré en degrés.

B. Cas du collagène et de la gélatine

Dans le cas des transitions conformationnelles pelotes-hélice, on observe une variation importante du pouvoir rotatoire. Pour le collagène, Von Hippel et Wong (1963) ont montré que pour des longueurs d'onde supérieures à 300 nm, la dispersion rotatoire suit une loi de Drude à un seul terme :

$$[\alpha]_{\lambda,T} = A \frac{\lambda_c^2}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

$$\text{avec } \lambda_c = 210 \pm 5 \text{ nm}$$

Cette relation s'applique aussi bien aux solutions de bâtonnets natifs et dénaturés. Seule l'amplitude A du pouvoir rotatoire dépend du taux d'hélicité du système. Le collagène et la gélatine ont le même pouvoir rotatoire spécifique à l'état dénaturé, puisque celui-ci reflète la composition en acides aminés. On peut ainsi suivre la renaturation ou la fusion des hélices en suivant l'évolution du pouvoir rotatoire au cours d'un abaissement ou d'élévation de température.

La même loi est vérifiée sur des solutions et des gels de gélatine, avec la même valeur de λ_c . Cette particularité conduit à estimer le « taux d'hélicité » (χ) dans les gels de gélatine à partir des mesures de pouvoir rotatoire, par la relation :

$$\chi = \frac{[\alpha]_{\lambda}^{obs} - [\alpha]_{\lambda}^{sol}}{[\alpha]_{\lambda}^{100\%hélice} - [\alpha]_{\lambda}^{sol}}$$

Cette définition suppose que la gélatine à l'état sol est entièrement sous la forme de pelotes (χ) et que les solutions de collagène natif représentent 100 % d'hélices.

C. Appareillage

Les mesures de pouvoir rotatoire sont effectuées avec un polarimètre Perkin Elmer 341 (Figure 41). Cet appareil est automatisé, il mesure l'angle de déviation avec une précision de $\pm 0.001^\circ$. La cellule de mesure est en verre, son chemin optique est de 0.1 dm et sa contenance de 1 ml. Cette cellule à double paroi est connectée à :

- un bain marie « Ministat », à 51°C qui permet de maintenir la gélatine contenue dans la cellule à la température d'analyse de 51°C
- un Cryostat « Lauda RM6 », qui après bascule sur le circuit froid permet de fixer la température de la cellule à 20°C .

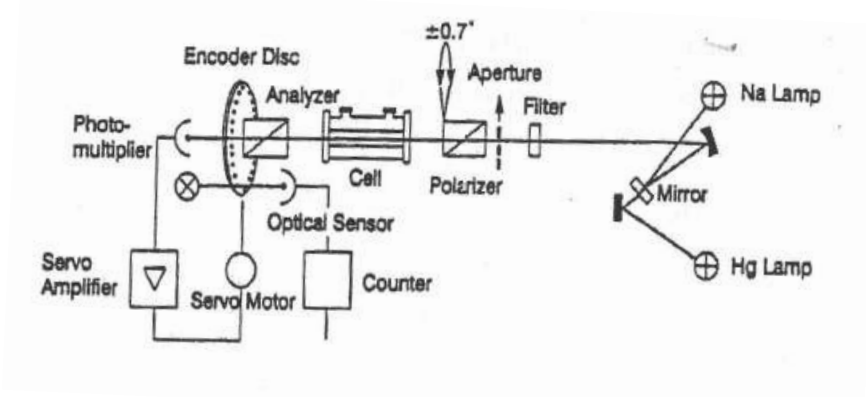


Figure 41: Représentation schématique du fonctionnement du polarimètre Perkin Elmer 341

Une radiation monochromatique sélectionnée par un filtre traverse l'ouverture, le polariseur, la cellule et l'analyseur croisé pour atteindre le photomultiplicateur. Le polarimètre est muni de deux lampes : une lampe à mercure (Hg) permettant de travailler aux longueurs d'onde 365, 436, 546 et 578 nm et une au sodium (Na) à 589 nm.

Un ordinateur est connecté au polarimètre et permet d'acquérir simultanément le temps, la mesure de l'angle de rotation et la température, grâce à un logiciel développé spécialement par le fabricant.

D. Mode opératoire

1. Préparation de la solution de gélatine

La préparation a été effectuée de la même façon pour les échantillons vieillis et non-vieillis :

- 4 g \pm 0,03g sont pesés et ajouter à 96 g de tampon phosphate « 2mM Na₂HPO₄ +14 mM NaCl pH 6 »
- les grains sont mis à gonfler pendant 30 minutes, sous agitation
- la solution est ensuite mise à fondre dans un bain marie à 60°C pendant 30 minutes, sous agitation
- les mesures suivent immédiatement la fonte

2. Mesures

Sur le polarimètre on mesure le pouvoir rotatoire spécifique à la longueur d'onde $\lambda=436$ nm, lors d'un refroidissement brutal.

$$[\alpha]_{436} = \frac{\alpha_{436}}{cd}$$

La cellule du polarimètre est remplie d'une solution de gélatine à 4% (3ml), à l'aide d'une pipette pasteur. S'assurer qu'il n'y a pas de bulle d'air sur le trajet optique. Après stabilisation du pouvoir rotatoire spécifique à 50°C ($[\alpha]_{436}$), on bascule sur le circuit d'eau froide

E. Résultats de polarimétrie

Le *Tableau 9* reprend les différentes valeurs du pouvoir rotatoire à 436 nm, des gélatines vieilles et non-vieilles.

Tableau 9: Valeurs du pouvoir rotatoire à 436 nm pour les gélatines non-vieilli et vieilles

| Temps en secondes | Gélatine non vieilli | Gélatines vieilles | | |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------|---------|
| | 0 | 2 jours | 6 jours | 8 jours |
| 0 | -248,5 | -236,5 | -232,5 | -243,5 |
| 60 | -256 | -242,5 | -240,3 | -251 |
| 120 | -265,8 | -251,5 | -248,5 | -260,3 |
| 180 | -278 | -261,8 | -258,5 | -270 |
| 240 | -292,5 | -272,3 | -268,3 | -279,5 |
| 300 | -306,5 | -281,8 | -276,5 | -287 |
| 420 | -328,3 | -295,3 | -288,5 | -297,3 |
| 600 | -350 | -309,3 | -300,5 | -307,8 |
| 900 | -372,8 | -324,3 | -313,3 | -318,8 |
| 1200 | -387 | -334,3 | -322 | -326,5 |
| 1500 | -396,8 | -341,5 | -328,5 | -332 |
| 1800 | -404,3 | -347 | -333,3 | -336,3 |
| 2400 | -414,8 | -355,5 | -340,8 | -343 |
| 3600 | -427,8 | -366 | -350,5 | -351,5 |
| 7200 | -446,5 | -382 | -365,3 | -365,3 |
| 9600 | -453 | -388 | -371 | -370,5 |
| 10800 | -455,8 | -390,5 | -373,3 | -372,5 |
| 14400 | -462 | -396 | -378,5 | -377,5 |
| 18000 | -466,8 | -400,3 | -382,5 | -381,3 |
| 21600 | -470,3 | -403,5 | -385,5 | -384 |
| 25200 | -473,5 | -406 | -388 | -386,5 |
| 28800 | -476 | -408,3 | -390,3 | -388,5 |
| 32400 | -478,3 | -410,5 | -392 | -389,8 |
| 36000 | -480 | -412,3 | -393,8 | -391,5 |
| 39600 | -481,8 | -413,8 | -395,3 | -393 |
| 43200 | -483,5 | -415,3 | -396,5 | -393,3 |
| 46800 | -484,5 | -416,3 | -397,8 | -394,5 |
| 50400 | -486,3 | -417,8 | -398,8 | -395,5 |
| 54000 | -487,3 | -418,8 | -400 | -396,8 |
| 57600 | -488,5 | -419,8 | -401 | -397,5 |
| 61200 | -489,5 | -420,5 | -401,3 | -398 |

On calcule ensuite le taux d'hélice (χ), à partir des mesures de pouvoir rotatoire spécifique,

par la relation :
$$\chi = \frac{[\alpha]_{436}' - [\alpha]_{436}^0}{[\alpha]_{436}^{100\% \text{ hélice}} - [\alpha]_{436}^0}$$

Avec, $[\alpha]_{436}^{100\% \text{ hélice}} = -800^\circ$, correspond au collagène natif, pris comme référence de 100 % d'hélice et

$[\alpha]_{436}^0$ = au pouvoir rotatoire spécifique au temps 0, moment où la gélatine est à l'état « sol » à 50°C

Tables des illustrations

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Formule chimique générale des acides aminés | 17 |
| Figure 2: Formation liaison peptidique..... | 17 |
| Figure 3: Types de liaisons susceptibles de se former entre les différentes chaînes d'une molécule de protéine | 19 |
| Figure 4: Schématisation des différentes structures d'une protéine (astrosurf)..... | 20 |
| Figure 5: Structure du collagène à différentes échelles : | 21 |
| Figure 6: Procédé de fabrication industrielle de la gélatine (Gelatin Manufacturers of Europe)..... | 24 |
| Figure 7: Nouilles de gélatine (Gelatin Handbook) | 27 |
| Figure 8: Produits de la dépolymérisation du collagène (d'après Rose, 1987) | 32 |
| Figure 9: Distribution typique en masse moléculaire des gélatines de type A et B (Gelatin Handbook)..... | 33 |
| Figure 10: Schéma de renaturation de la gélatine (Harrington et Rao, 1970)..... | 35 |
| Figure 11: Mécanisme de désamination oxydative (Digenis et al., 1994) | 40 |
| Figure 12: Réaction d'une amine avec un sucre (Digenis et al., 1994)..... | 41 |
| Figure 13: Action du Formaldéhyde (Digenis et al. 1994) | 42 |
| Figure 14: Représentation schématique d'une cellule AFIFFF (Rbii et al., 2009)..... | 48 |
| Figure 15: Représentation schématique de la répartition des fractions de l'échantillon dans la cellule (Christoph Wabel, 1998)..... | 49 |
| Figure 16: Schéma des types de diffusion de la lumière laser en fonction du volume occupé par la molécule..... | 51 |
| Figure 17: Diagramme de Zimm (Zimm, 1948) | 52 |
| Figure 18: Gradient de Flux Force appliqué : 1 « Focusing » ; 2 Elution..... | 54 |
| Figure 19: Fractogramme d'une solution de gélatine | 55 |
| Figure 20: Identification des fractions protéiques de la gélatine | 57 |
| Figure 21: Echantillon de gélatine vieilli à 2 jours | 69 |
| Figure 22: Effet du traitement thermique sur la gélatine | 70 |
| Figure 23: Effet du traitement thermique sur la réorganisation de la gélatine en triples hélices | 75 |
| Figure 24: Fractogramme UV de la gélatine A : pendant la renaturation ; B : après le vieillissement accéléré | 88 |
| Figure 25: Fractogramme UV d'une gélatine vieillie..... | 89 |
| Figure 26: Evolution des fractions massique en fonction du temps de maturation A: gélatine native; B: gélatine vieillie..... | 90 |
| Figure 27: Evolution du taux d'hélices en fonction du temps | 92 |
| Figure 28: Réorganisation partielle en triple hélice de la gélatine après un vieillissement accéléré | 93 |
| Figure 29: Vieillissement accéléré de la gélatine: A. 0 jour ; B. 30 jour | 96 |
| Figure 30: Réaction de Maillard (Biochem-Agro, Université Lille)..... | 97 |
| Figure 31: Formules chimiques de la lysine et de sa forme disponible. | 99 |
| Figure 32: Réaction de dérivation de la lysine disponible avec FDNB | 100 |
| Figure 33: Exemple de segmentation de fractogramme..... | 123 |
| Figure 34: Profils U.V. des gélatines issues d'un traitement acide | 124 |
| Figure 35: Fractogramme gélatines issues traitement chaulé | 124 |
| Figure 36: Corrélations données AFIFFF-MALS par ACP..... | 125 |
| Figure 37: Discrimination échantillons en fonction des données AFIFFF-MALS | 127 |
| Figure 38: Discrimination des échantillons en fonction des données AFIFFF-MALS, la viscosité et le taux de lysine | 128 |
| Figure 39: Classement des échantillons en fonction du site de production (Données AFIFFF-MALS)..... | 129 |
| Figure 40: Classement des échantillons en fonction du site de production (Données AFIFFF-MALS, Viscosités et taux de lysine libre) | 130 |
| Figure 41: Représentation schématique du fonctionnement du polarimètre Perkin Elmer 341 | 137 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: Bilan mondial de la production en gélatine (milliers de tonnes) (Wiley, Gelatin Handbook) | 16 |
| Tableau 2: Liste des acides aminés | 18 |
| Tableau 3: Exemples de Blooms par application..... | 28 |
| Tableau 4: Comparaison des compositions types en acides aminés des gélatines de type A, de type B et du collagène; exprimées en résidus pour 1000 résidus d'acides aminés (Rose, P.I., Gelatin in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 1987)..... | 31 |
| Tableau 5: Rôle de la nature de l'acide aminé sur le brunissement au cours de la réaction de Maillard (d'après Lento et al., 1960) | 98 |
| Tableau 6: Caractéristiques des échantillons Rousselot | 121 |
| Tableau 7: Tableau récapitulatif des données utilisées en statistique | 123 |
| Tableau 8: Contribution des variables (%) à la constitution des axes..... | 126 |
| Tableau 9: Valeurs du pouvoir rotatoire à 436 nm pour les gélatines non-vieilli et vieilliées | 139 |

Références Bibliographiques

A

- Andersson, M., Wittgren, B., & Wahlund, K.G. (2001). Ultrahigh molar mass component detected in ethylhydroxyethyl cellulose by asymmetrical flow field-flow fractionation coupled to multiangle light scattering. *Analytical Chemistry*, 73(20), 4852-4861.
- Albala-Hurtado, S., Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Noqués, M.T. & Vidal-Carou, M.C. (1997). Determination of available lysine in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778, 235-241.

B

- Bailey, A. (1985). Round table session 1 – Structure of collagen. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A. J. Bailey (Eds.). *Advances in meat research* (vol. 4, pp. 131–143). New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Bailey, A. (1991). The chemistry of natural enzyme-induced cross-links of proteins. *Amino acids*, 1, 293-306.
- Beckett, R., Bigelow, J.C., Zhang, J. & Giddings, J.C. (1989). Influence of aquatic human substances on fate and treatment of pollutants. P. MacCarthy and I.H. Suffet, Eds., *ACS Advances in Chemistry Series 219* (American Chemical Society, Washington, DC) Chap 5.
- Biemel, K.M, Conrad, J., Lederer, M.O. (2001). Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling the structure of a pentosidine precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23405-23412.
- Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. (2004). Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, 25, 5675-5680.
- Blom, L., Hendricks, P. & Caris, J. (1967). Determination of Available Lysine in Foods. *Analytical Biochemistry*, 21(3), 1967, 382-400.
- Boedtker, H., & Doty, P. (1954). A Study of Gelatin Molecules, Aggregates and Gels. *The journal of physical chemistry*, 58 (11), 968–983.
- Boedtker, H., & Doty, P. (1956). The native and denaturated states of soluble collagen. *Journal of the American Chemical Society*, 78(17), 4267-4280.
- Bornstein P & Traub W. The chemistry and biology of collagen. (Neurath H & Hill R L, eds.) *The proteins*. New York: Academic Press. 1979. Vol. 4. p 457-461
- Bosch, E. & Gielens, C. (2003). Gelatin degradation at elevated temperature. *International Journal of biological macromolecules*, 32, 129-138.
- Brownlee, M. Cerami, A. & Vlassara, H. (1988). “Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications,” *The New England Journal of Medicine*, 318 (20), pp.1315-1321.

- Brown, J., Madit, N., Cole, E.T., Wilding, I.R., & Cadé, D. (1996). The effect of cross-linking on the in vivo desintegration of hard gelatin capsules. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1026-1030.
- Busnel, J.P., Morris, E.R., Ross-Murphy, S.B. (1989). Interpretation of the renaturation kinetics of gelatin solutions. *International Journal of Biological Macromolecule*, 11, 119-125.

C

- Caldwell, K.D. & Gao, Y.-S. (1993). Electrical field-flow fractionation in particle separation. 1. monodisperse standards. *Analytical Chemistry*, 65, 1764-1772.
- Carstensen, J.T., Rhodes, C.T. (1993). Pellicle formation in gelatin capsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19, 2709-2712.
- Carvalho, R.A., & Grosso, C.R.F. (2006). Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23(1), 45-53.
- Carpenter, K.J. (1966). The estimation of the Available Lysine in Animal-Protein foods. *Biochemistry Journal*, 77, 604-610.
- Castillo, G., Sanz, M. A., Serrano, M.A., Hernandez, T. & Hernandez, A. (1997). An Isocratic High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determining the Available Lysine in Foods. *Journal of Chromatographic Science*, 35(9), 1997, 423-429.
- Chafetz, L., Hong, W., Tsilifonis, D.C., Taylor, A.K., & Philip, J.J. (1984). Decrease in the rate of capsule dissolution due to formaldehyde from polysorbate 80 auto-oxidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73, 1186-1187.
- Chiwele, I., Jones, B.E., & Podczek, F. (2000). The shell dissolution of various empty hard capsules. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 48(7), 951-956.
- Cordes, E.H., Jencks, W.P. (1962). On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis1. *Journal of the American Chemical Society*, 84, 832-837.
- Cortesi, R., Nastruzzi, C. and Davis, S.S. (1998). Sugar cross-linked gelatin for controlled release: microspheres and disks. *Biomaterials*, 19: 1641-1649.

D

- Denis, A., Brambati, N., Dessauvages, B., Guedj, S., Ridoux, C., Meffre, N., & Autier, C. (2008). Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids*, 22, 989-994.
- Digenis, G.A., Gold, T.B., & Shah, V.P. (1994). Cross-linking of gelatine capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *Journal of Pharmaceutical Science*, 83(7), 915-921.
- Djabourov, M., Leblond, J. & Papon, P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *Journal de Physique France*, 49, 319-332.
- Djabourov, M. Maquet, J. Theveneau, H., Leblond, J., & Papon, P. (1985). Kinetics of gelation of aqueous gelatin solutions. *British Polymer Journal*, 17 (2), 169-174.

- Djabourov, M., & Papon, P. (1983). Influence of thermal treatments on the structure and stability of gelatin gels. *Polymer*, 24, 537-542.
- Doelker, E., Vial-Bernasconi, A.C., 1998. Interactions contenant-contenu au sein des capsules gélatineuses et évaluation critique de leurs effets sur la disponibilité des principes actifs. *STP Pharma*, 4, 298-306.

F

- Farahnaky, A., Grau, D.A., Mitchell, J.R., Hill, S.E. (2003). Ascorbic acid and hydrogen peroxide (Fenton's reagent) induced changes in gelatin systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 321-326.
- Fernandez-Artigas, P., Garcia-Villanova, B. & Guerra-Hernandez, E. (1999). Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 79, 851-854.
- Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., Olcott, H.S. (1945). The reaction of formaldehyde with proteins". *Journal of the American Chemical Society*, 67, 950-954.
- Franzblau, C. (1970) in *Comprehensive Biochemistry* (Florkin, M., and Stotz, E.H., Eds.: Elsevier: New York, 1971; Vol. 26c, pp659-712
- Fraunhofer, W., Winter, G., Coester, C. (2004). Asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering for analysis of gelatin nanoparticle drug carrier systems. *Analytical Chemistry*, 76(7), 1909-1920
- French, D. & Edsall, J.T. (1945). The reaction of formaldehyde with amino acids and proteins. *In Advances in Protein Chemistry*, 11, 277-335.
- Friedman, M. (1982). Chemically reactive and unreactive lysine as an index of browning. *Diabetes*, 31 (3), 5-14
- Fuget, E., Platerink, C.V., & Janssen, H.G. (2007). Analytical characterisation of glutardialdehyde cross-linking products in gelatine-gum arabic complex coacervates. *Analytica Chimica Acta*, 604(1), 45-53.

G

- Giddings, J.C., Yang, F.J., & Myers, M.N. (1977). Flow field-flow fractionation as a methodology for protein separation and characterization. *Analytical Biochemistry*, 81(2), 395-407.
- Giddings, J.C. & Ho, J. (1995). Accurate Measurement of Density of Colloidal Latex Particles by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Langmuir*, 11, 2399-2404.
- G.M.E: Gelatine Manufacturers of Europe: <http://www.gelatine.org>.
- Godard, P., Biebuyck, J.J., Daumerie, M., Naveau, H. & Mercier, J.P. (1978). Crystallization and melting of aqueous gelatin. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 16 (10), 1817-1828.
- Gorham, S.D. (1991). "Collagen," in *Biomaterials. Novel Materials from Biological Sources*, D. Byrom, ed., New York, NY: Stockton Press, pp. 55-122. 49.

Guo, L., Colby, R.H., Lusignan, C.P., Whitesides. (2003). Kinetics of the triple helix formation in semidilute gelatin solutions. *Macromolecules*, 36, 9999-10008.

H

Harding, J. J. (1965). The unusual links and cross-links of collagen. *Advances in Protein Chemistry*, 20, 109–190.

Harrington, W.F., & Rao, N.V. (1970). Collagen structure in solution. I. Kinetics of helix regeneration in single-chain gelatins. *Biochemistry*, 9 (19), 3714–3724.

Hanselmann, R., Burchard, W., Ehrat, M., & Widmer, H.M. (1996). Structural properties of fractionated starch polymers and their dependence on the dissolution process. *Macromolecules*, 29(9), 3277-3282.

Hanselmann, R., Ehrat, M., & Widmer, H.M. (1995). Sedimentation Field Flow Fractionation combined with Multi Angle Laser Light Scattering applied for characterization of starch polymers. *Starch / Stärke*, 9: 345-349.

Herning, T., Djabourov, M., Leblond, J., & Takerkart, G. (1991). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 2. A quasi-elastic light scattering study. *Polymer*, 32 (17), 3211-3217.

Hopkins, D.T. (1981) Effects of variation in protein digestibility. In *Protein quality in humans: assessment and in vitro estimation*. Bodwell, C.E., Adkins, J.S., Hopkins, D.T., Eds ; AVI Publishing Westport, Connecticut, 1981, 169-193.

Horský, J., & Švantner, J. (1993). Gelatin renaturation and viscosity of dilute gelatin solutions. *Polymer International*, 32, 159-164.

Hurrell, R.F. & Carpenter, K.J. (1981) The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. *Progress in Food and Nutrition Science*, 5, 159-176.

Hwang, J.S., Yang, Z.P., Dai, S.B., Tyan, S.L., Kuo, M.T., & Lin, C.L. (1998). Diffusion analysis of gelatin solutions by photocorrelation spectroscopy. *Chinese Journal of Physics*, 36 (5), 733-745.

J

Jackson, S.F., Harkness, R. D., Partridge, S. M. & Tristram, G. R., eds (1965). Structure and function of connective and skeletal tissue. Butterworths London. 537 p.

Jirgensons, B. (1969). Optical Rotatory dispersion of proteins and other macromolecules. Springer-Verlag, Berlin, Helderberg, New-York.

Jones, B.E. (1987). In hard capsules-development and technology; Ridgway, K., Ed; *The Pharmaceutical: London, U.K.*, pp 39-48.

K

- Kakade, M.L. & Liener, I.E. (1969). Determination of Available Lysine in Proteins. *Analytical Biochemistry*, 27, 273-280.
- Kirkland, J.J. & Yau, W.W. (1983). Simultaneous determination of particle size and density by sedimentation field flow fractionation. *Analytical Chemistry*, 55 (13), 2165- 2170.
- Koehler, K., Sandstrom, W., Cordes, E.H, 1964. Concerning the Mechanism of the Hydrolysis and Aminolysis of Schiff Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 86 (12), 2413-2319.
- Kühn, K. (1987). Structure and function of collagen types; Mayne, R., Burgeson, R.E., Eds.; *Academic Press: New York*.

L

- Ledward, D.A. (1986). Gelation of gelatin. In J.R. Mitchell, & D.A. Ledward (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp.171-201). London: Elsevier Applied Science.
- Lemelin, E., Aussenac, T., Violleau, F., Salvo, L. & Lein, V. (2005). Impact of cultivar and environment on size characteristics of wheat proteins using asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angular laser light scattering. *Cereal Chemistry*, 82 (1), 28-33.
- Lento, H. G., Underwood, J. C., Willits, C. O., (1960). Browning of sugar solutions. V. Effect of pH on the browning of trioses. *Food Research*, 25, 757- 763.
- Litzén, A., Walter, J.K., Krischollek, H., & Walhund, K.G. (1993). Separation and quantitation of monoclonal antibody aggregates by asymmetrical flow field-flow fractionation and comparison to gel permeation chromatography. *Analytical Biochemistry*, 212 (2), 469-480.
- Liu, M.K., Li, P. & Giddings, J.C. (1991). Separation and measurement of diffusion coefficients of linear and circular DNAs by flow field-flow fractionation. *Macromolecules*, 26, 3576-3588.
- Liu, M.K., Li, P. & Giddings, J.C. (1992). Separation of particles in aqueous suspensions by thermal field-flow fractionation. Measurement of thermal diffusion coefficients. *Chromatographia*, 34, 483-492.
- Liu, M.K., Li, P. & Giddings, J.C. (1993). Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field flow fractionation. *Protein Science*, 2, 1520-1531
- Lou, J., Myers, M.N., & Giddings, J.C. (1994). Separation of polysaccharides by thermal field-flow fractionation. *Journal of liquid chromatography*, 17 (14), 3239-3260.
- Lundin, L., Norton, I.T., Foster, T.J., Williams, M.A.K., Hermansson, A.-M., & Bergström, E. (2000). Phase separation in mixed biopolymers systems. In P.A. Williams, & G.O. Phillips, *Gums and stabilisers for the food industry* (pp. 167-180), Vol.10. Royal Society of Chemistry.

M

- Machiels, D. & Istasse, L. (2002). La reaction de Maillard: Importance et applications en chimie des aliments. *Annale de médecine Vétérinaire*, 146, 347-352.
- Marchais, H., Cayzeele, G., Legendre, J.Y., Skiba, M., & Arnaud, P. (2003). Cross-linking of hard gelatin carbamazepine capsules: effect of dissolution conditions in vitro drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 129-132.
- Marks, E.M. Tourtellotte, D. Andux, A. (1968). The phenomenon of gelatin insolubility. *Food Technology*, 22, 1433-1436.
- Melia, C.D. (1983). Some physical properties of gelatin films in relation to hard capsule production. PhD thesis, University of Nottingham.
- Meyer, M., & Morgenstern, B. (2003). Characterization of gelatin and soluble collagen by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). *Biomacromolecules*, 4, 1727-1732.
- Meyer, M.C., Straughn, A.B., Mhatre, R.M., Hussain, A., Shah, V.P., Bottom, C.B., Cole, E.T., Lesko, L.L., Mallinowski, H., & Williams, R.L. (2000). The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules. *Pharmaceutical Research*, 17 (8), 962-966.
- Mohamed, S.B. & Stainsby, G. (1984). Lysine availability in Protein-Alginate ester Gels. *Food Chemistry*, 14, 1-10.
- Moll, N. (1993). Schéma du principe des réactions de brunissement non enzymatique. *Actualités technique et industrielles*, 301-307.
- Moughan, P.J. & Rutherford, S.M. (1996). A New Method for determining Digestible Reactive Lysine in Foods. *Journal of Agricultural of Foods Chemistry*, 44, 2202-2209.
- Murthy, K.S., Enders, N.A., & Fawzi, M.B. (1989a). Dissolution stability of hard-shell capsule products, part I: the effect of exaggerated storage conditions. *Pharmaceutical Technology*, 13, 72-85.
- Mwangi, J.W., Ofner III, C.M. (1995). Modulation and evaluation of the degree of crosslinking in gelatin hydrogel matrices using a water soluble carbodiimide. *Pharmaceutical Research*, 12, S-212.
- Myers, M.N. (1997). Overview of field-flow fractionation. *Journal of Microcolumn Separation*, 9(3), 151-162.

O

- Olivares, M.L., Peirotti, M.B., & Deiber, J.A. (2006). Analysis of chain association in dilute aqueous solutions through viscosity data. *Food Hydrocolloids*, 20, 1039-1049.
- Ofner, C.M., Zhang, Y., Jobeck, V.C., & Bowman, B.J. (2001). Crosslinking studies in gelatin capsules treated with formaldehyde and in capsules exposed to elevated temperature and humidity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 79-88.

P

- Pezron, I., Djabourov, M. & Leblond, J. (1990). Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A light and small-angle neutron scattering study. *Polymer*, 32 (17), 3201-3209.
- Piez, K.A. (1967). *In Treatise on Collagen*. Academic Press: New York.

R

- Rabasseda, J., Rauret, G., & Galceran, M.T. (1988) Liquid-chromatographic determination of available lysine in soybean and fish-meal. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71(2), 350-353.
- Ramirez-Jimenez, A., Garcia-Villanova, B. & Guerra-Hernandez, E. (2004): Effect of storage conditions and inclusion of milk on available lysine in infant cereals. *Food Chemistry*, 85(2), 239-244.
- Rbii, K., Violleau, F., Guedj, S., & Surel, O. (2009). Analysis of aged gelatin by AFIFFF-MALS: Identification of high molar mass components and their influence on solubility. *Food Hydrocolloids*, 23, 1024-1030
- Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, & B., Cinque, L. (2005). On-line hollow-fiber flow field-flow fractionation-electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry of intact proteins. *Analytical Chemistry*, 77(1), 47-56.
- Rose, P.I. (1987). *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd edition, Volume 7.
- Rufian-Heranes, J.A., Guerra-Hernandez, E. & Garcia-Villanova, B. (2006). Available lysine and fluorescence in heated milk proteins/dextrinomaltose or lactose solutions. *Food Chemistry*, 98(4), 685-692.
- Rutherford, S.M. & Moughan, P.J. (1990). Guanidination of lysine in selected dietary proteins. *Journal of Agricultural of Foods Chemistry*, 38(1), 209-211.

S

- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatin Handbook: Theory and Industrial Practice*. Wiley-VCH.
- Segtnan, V.H., Kvaal, K., Rukke, E.O., Schuller, R.B., & Isaksson, T. (2003). Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatine using near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 17, 585-592.
- Stainsby, G. (1977). The physical chemistry of gelatin. In A.G. Wand & A. Courts, *the science and technology of gelatin* (pp.109-136). London: Academic press.
- Stejskal, J., Straková, D. & Kratochvíl, P. (1986). Molecular characterization of gelatin by light scattering. *Die Makromolekular Chemie*, 188 (4), 855-860.

T

Torbatinejad, M.N., Rutherford, S.M. & Moughan, P.J (2005). Total and Reactive Lysine Contents in Selected Cereal-Based Food Products. *Journal of Agricultural of Foods Chemistry*, 53(11), 4454-4458.

Tromp, R.H., ten Grotenhuis, E., & Olieman, C. (2002). Self-aggregation of gelatine above the gelling temperature analysed by SEC-MALLS. *Food Hydrocolloids*, 16, 235-239.

U-V

Vassileva, E., Baltá-Calleja, F. J., Cagiao, M. E., Fakirov, S. (1998) Gelatin films with very high surface hardness. *Macromolecular Rapid Communications*. 19 (9), 451-454.

Veis, A. (1964). *The macromolecular chemistry of gelatin*. Academic Press: London.

Viebke, C., & Williams, P.A. (2000). Determination of molecular mass distribution of κ -carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field flow fractionation. *Food Hydrocolloids*, 14, 265-270.

Von Hippel, P.H., & Wong, K.Y. (1963). The Collagen [UNK] Gelatin Phase Transition. II. Shape of the Melting Curves and Effect of Chain Length*. *Biochemistry*, 2 (6), 1399-1413.

W

Wabell, C. (1998). Thèse: Influence of Lecithin on Structure and Stability of Parenteral Fat Emulsions.

Wahlund, K.G., Gustavsson, M., MacRitchie, F., Nylander, T., & Wannerberger, L. (1996). Size characterisation of wheat proteins, particularly glutenin, by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Cereal Science*, 23, 113-119.

Wahlund, K.G., in: Schimpf, M.E., Caldwell, K.D., Giddings, J.C. (Eds) (2000). *Field-Flow Fractionation Handbook*. New York: John Wiley & Sons.

Ward, A.G., & Courts, A. (1977). *The science and technology of gelatin*. London: Academic Press.

Wittgren, B., & Wahlund, K.G. (1997). Effects of flow-rates and sample concentration on the molar mass characterisation of modified celluloses using asymmetrical flow field-flow fractionation-multi-angle light scattering. *Journal of Chromatography A*, 791, 135-149.

Wittgren, B., & Wahlund, K.G. (2000). Size characterization of modified celluloses in various solvents using flow FFF-MALS and MB-MALS. *Carbohydrate Polymers*, 43, 63-73.

Wyatt, P. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, 272 (1), 1-40.

Y

Yannas, I. V., & Tobolsky, A. V. (1967). Cross-linking of gelatine by dehydration. *Nature (London)* 215, 509-510.

You, S., Stevenson, S. G., Izydorczyk, M. S. & Preston, K. R. (1979). *Cereal Chemistry* 5: 624-630.

Z

Zimm, B.J. (1948). The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *Journal of Chemical Physics*, 16 (12), 1093-1099.

Sources internet

Figure 4: <http://www.astrosurf.com/luxorion/bio-fonctionnement cellules2.html>

Figure 5: <http://www.cegep-ste-fov.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/fva/chimcell/notesmolecules/proteines 3.html>

Figure 6: <http://www.gelatine.org>

Figure 30: http://biochim-agro.univ-lille1.fr/brunissement/co/ch1_Introduction.html